

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química  
Grupo de Engenharia Genômica

**Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e *Quorum sensing* em  
*Chromobacterium violaceum***

CRISTIANA GOMES DE OLIVEIRA  
Engenheira Química, M.Eng.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção  
do título de Doutor em Engenharia Química

Florianópolis, 16 de maio de 2005.  
SC-Brasil

**Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e *Quorum sensing* em  
*Chromobacterium violaceum***

Por

CRISTIANA GOMES DE OLIVEIRA

Tese julgada para a obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)

Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Vasconcelos Antônio (BQM/UFSC)

Co-orientadores: Prof. Paul Williams; Dr. Miguel Cámara  
(The University of Nottingham)

**Banca Examindadora:**

Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)) – presidente (orientador)

Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antônio (BQM/UFSC)) – co-orientadora

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior (EQA/UFSC) – membro interno

Prof. Dr. Mário Steindel (MIP/UFSC) – membro interno

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert (USP) – membro externo

Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima (UNIVALI) – membro externo

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas junto ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos junto ao Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal de Santa Catarina. Parte desta tese foi realizada no Instituto de Infectologia, Imunologia e Inflamação, localizado junto ao Centro de Ciências Biomoleculares, na Universidade de Nottingham (Nottingham, Inglaterra), dentro da modalidade doutorado sanduíche.

Esta Tese é dedicada ao meu esposo,  
Diego Dal’Molin, meu maior incentivador,  
meu amor e meu amigo de todas as horas.

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein.

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Grupo de Engenharia Genômica da UFSC, em especial aos meus orientadores, Prof. Luismar Marques Porto e Profa. Regina Vasconcellos Antônio, e também ao Grupo Quorum Sensing da Universidade de Nottingham, em especial ao Prof. Paul Williams, Dr. Miguel Câmara e Dr. Steve Atkinson pelo incentivo e colaboração dedicados a esta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos àqueles que em mim depositaram confiança e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Em especial à minha família, ao meu esposo e aos meus amigos pelo apoio, carinho e incentivo.

O desenvolvimento desta pesquisa conta com o apoio financeiro da CAPES/CNPq a quem estendo meus agradecimentos.

## Resumo

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa, violeta-pigmentada, aeróbica facultativa, que vive em regiões de climas tropicais e subtropicais, encontrada principalmente em solos e rios. Este microrganismo tem capacidade de produzir metabólitos de interesse biotecnológico, como por exemplo, a produção de antibióticos, agentes anti-tumorais e biopolímeros. Estas foram algumas das razões que levaram esta bactéria a ter o seu genoma seqüenciado por uma rede nacional de seqüenciamento de DNA, composta por 25 grupos de pesquisa de todo o país (<http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>). Com o seqüenciamento do genoma da *C. violaceum* (linhagem ATCC 12472), o Brasil se incluiu entre os países com grande interesse na fisiologia e potencial biotecnológico desta bactéria. Uma das características mais notáveis da *C. violaceum* é a produção de um pigmento de cor violeta, chamado violaceína, quando cultivada sob condições de aerobiose. Este metabólito e derivados da mesma via têm sido alvo de estudos por apresentarem potencial farmacológico. Neste trabalho são investigados os genes envolvidos na regulação da biossíntese de violaceína, bem como o mecanismo de regulação *quorum sensing* em *C. violaceum* (linhagem ATCC 12472; mesma linhagem seqüenciada). Além dos genes *cviI* e *cviR* (homólogos aos genes que caracterizam o sistema *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas), outros genes foram encontrados serem reguladores da produção de violaceína. Através da análise de homologia entre seqüências e estruturas de proteínas, gerou-se um modelo da estrutura tridimensional do domínio C-terminal da proteína regulatória CviR, que tem uma ação importante no controle transcricional da expressão do operon *vioABCD* em *C. violaceum*. Os genes de regulação da biossíntese de violaceína foram investigados através da construção de mutantes por inserção de transposon (mini-Tn5 *luxCDABE*). Tais mutantes apresentam pouca produção de pigmento em relação à linhagem selvagem ATCC 12472. Moléculas de sinalização *quorum sensing*, N-acil-homoserinas lactonas (AHL), também foram investigadas na linhagem selvagem e nas mutantes. Três tipos de moléculas AHL foram identificadas na linhagem selvagem ATCC 12472, sendo que duas são de cadeia curta (N-hexahoil-L-homoserina lactona (HHL); N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL)) e uma de cadeia longa (N-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL)), o que demonstra maior complexidade no circuito de regulação *quorum sensing* nesta linhagem de *C. violaceum*. Outra forma de regulação da produção de violaceína também foi explorada neste trabalho, assim

como a atuação do complexo cAMP-CAP na transcrição do gene *viR*, que resulta no estímulo da produção de violaceína quando há baixos níveis de glicose. Um modelo da arquitetura da rede de regulação do operon *vioABCD* foi desenvolvido com base no mecanismo *quorum sensing* utilizando-se a técnica matemático-computacional de redes de Petri híbrida. O modelo gerou resultados semi-quantitativos para diferentes condições de simulação, prevendo diferentes níveis de produção de violaceína frente ao nocauteamento de genes regulatórios e a presença de glicose ou glicerol no meio de cultura.



## Abstract

*Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative, aerobic facultative, purple-pigmented bacterium that lives in tropical and subtropical regions, mostly found in soil and rivers. *C. violaceum* is a microorganism that is able to produce metabolites with biotechnological roles such as antibiotics, anti-tumor agents, and biopolymers. These are some of the reasons why *C. violaceum* has been chosen to have its genome sequenced by a National Brazilian Sequencing Consortium, with 25 research groups from all over the country (<http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>). From the sequencing data of *C. violaceum* genome (strain ATCC 12472), Brazil has been included among the countries that have interest in studying the physiology and biotechnological potential of this bacterium. One of the most remarkable characteristics of *C. violaceum* is the production of a purple pigment known as violacein, when the bacterium is grown in aerobic conditions. Violacein and other metabolites of the same biosynthesis pathway have been exploited since they present pharmacological activities. In this work, genes involved in the regulation of violacein, as well as the quorum sensing mechanism in *C. violaceum* (ATCC 12472, the sequenced strain) were investigated. Besides *cviI* and *cviR* (homologs of genes that are responsible for quorum sensing in Gram-negative bacteria), other genes were found to regulate the violacein production. From homology analyses of sequences and protein structures, a three-dimensional model of the C-terminal domain of the regulatory protein CviR was generated. CviR has a role in the transcriptional control of the *vioABCD* operon expression. Known regulatory genes of violacein biosynthesis were investigated by constructing mutants by transposon insertion (*Tn5-luxCDABE*). Such mutants produce less purple pigment comparing to the wild type ATCC 12472. N-acyl-homoserine lactones (AHL), the quorum sensing signal molecules, were investigated in the wild type and mutants of *C. violaceum* as well. Three AHL molecules were identified in the *C. violaceum* ATCC 12472 wild type strain: two short chain AHL, N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL) and N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL); and one long chain AHL, N-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (OdDHL). This adds more complexity in the quorum sensing regulation mechanism. Another additional form of regulation of violacein production was examined in this work: the role of cAMP-CAP on the

*vi*R gene transcription, which results in a stimulus of violacein production due to low glucose levels in the culture media. A regulatory model of the *vioABCD* operon was developed based on the quorum sensing mechanism and using Hybrid Petri Nets as a mathematical/computational tool. The model provided semi-quantitative results to different simulation conditions, predicting different levels of violacein production when regulatory genes were knocked out and to glucose and/ or glycerol is the carbon source of the media culture.

# Abreviaturas

AHL	N-acil-L-homoserina lactona
Amp <sup>R</sup>	Resistência ao antibiótico ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHL	N-butanoil-L-homoserina lactona
bp	Pares de base (nucleotídeo)
cAMP	Monofosfato de adenosine cíclica
CAP	Proteína ativadora catabólica
CRP	Proteína receptora de cAMP
CoA	Coenzima A
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamino
HCL	Ácido clorídrico
HHL	N-hexanoil-L-homoserina lactona
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HTH	Domínio hélice-volta-hélice ( <i>helix-turn-helix</i> )
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobases
Km <sup>R</sup>	Resistência ao antibiótico canamicina
LB	Luria-Bertani (meio de cultivo)
NaOH	Hidróxido de sódio
OD	N-oxododecanoil-L-homoserina lactona
OdDHL	N-octanoil-L-homoserina lactona
OHL	N-oxohexanoil-L-homoserina lactona
OHHL	Densidade óptica
OOHL	N-oxooctanoil-L-homoserina lactona
ORF	<i>Opened reading frame</i> (quadro aberto de leitura)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Disulfato de sódio

Sm <sup>R</sup>	Resistência ao antibiótico estreptomicina
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
Tc <sup>R</sup>	Resistência ao antibiótico tetraciclina
TE	Solução tampão Tris-EDTA
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
u.v.	Ultra violeta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosideo

# Lista de Figuras

Figura 3.1	Organização do operon da lactose em <i>Escherichia coli</i> .	13
Figura 3.2	Atuação do complexo cAMP-CAP no operon <i>lac</i> .	15
Figura 3.3	Modelo da repressão da síntese de triptofano.	16
Figura 3.4	Controle do operon histidina.	17
Figura 3.5	Regulação da bioluminescência em <i>V. fischeri</i> .	20
Figura 3.6	Moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> .	25
Figura 3.7	Esquema da síntese de moléculas AHL por homólogos da LuxI.	27
Figura 3.8	Via de biossíntese de violaceína (August <i>et al.</i> 2000).	32
Figura 3.9	Exemplo de uma rede de Petri ordinária, antes (a) e depois (b) do disparo da transição T0.	41
Figura 3.10	Elementos da rede de Petri híbrida.	42
Figura 3.11	Estrutura da rede de Petri híbrida para a reação catalisada pela enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase.	44
Figura 4.1	Construção de mini-Tn5 contendo os genes <i>lux</i> conferindo resistência à canamicina.	53
Figura 4.2	Esquema da transformação por conjugação e diluição em série. Km: canamicina; EtBr: brometo de etídio.	55
Figura 4.3	Precipitação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) – mutante de ATCC 12472.	57
Figura 4.4	Eletroforese de DNA cromossomal extraído das mutantes CVm1 e CVm3 em gel agarose (1%) e corado por brometo de etídio.	58
Figura 4.5	Digestão parcial de DNA cromossomal através de diluição enzimática em série.	59
Figura 4.6	Eletroforese do produto de digestão parcial de DNA cromossomal a partir de uma diluição enzimática em série.	60

Figura 4.7	Eletoforese de pBluescript (KS+) digerido com <i>Bam</i> HI.	61
Figura 4.8	Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> .	63
Figura 4.9	Indução de violaceína em CV026 quando AHL de cadeia curta está presente no meio.	66
Figura 4.10	Teste T para verificação de presença de AHL de cadeia curta por teste T usando CV026 como biorrepórter (controle positivo YPIII: <i>Yersinia pestis</i> ).	67
Figura 5.1	Modelo Estrutural 3D proposto para CviR. Em preto é indicado o domínio C-terminal HTH.	74
Figura 5.2	Resultado da avaliação da estrutura 3D de CviR pelo Procheck.	75
Figura 5.3	Alinhamento entre a seqüência modelo e a seqüência de CviR utilizando o programa ClustalW.	76
Figura 5.4	Proposta da regulação do operon <i>vioABCD</i> por mecanismo de sinalização <i>quorum sensing</i> .	78
Figura 5.5	Região de promoção do operon <i>vioABCD</i> .	79
Figura 5.6	Cinética do crescimento celular de <i>C. violaceum</i> cultivada em meio líquido (NB) utilizando 1% de glicose ou de glicerol como fontes de carbono.	81
Figura 5.7	Cinética da produção de violaceína. <i>C. violaceum</i> foi cultivada em meio sólido (NB) utilizando 1% de glicose ou de glicerol como fontes de carbono e a temperatura foi mantida a 30°C.	81
Figura 5.8	Cromatografia em camada delgada (cinética em meio sólido).	82
Figura 5.9	Cromatografia de camada delgada de extrato de pigmento produzidos por <i>C. violaceum</i> (ATCC 12472) em meio sólido na presença de glicose e glicerol revelado com iodo gasoso.	83
Figura 5.10	Influência da concentração de HHL na produção de violaceína em CV026 utilizando diferentes fontes de carbono.	83
Figura 5.11	Influência da concentração de HHL na densidade celular de CV026 utilizando diferentes fontes de carbono.	85
Figura 5.12	Modelo hipotético da ativação do gene <i>cviR</i> pelo complexo cAMP-CAP em <i>C. violaceum</i> .	86
Figura 5.13	Fenótipo das mutantes de <i>C. violaceum</i> : repressão da produção de violaceína.	91
Figura 5.14	Resultado fenotípico da mutação de <i>C. violaceum</i> – repressão de violaceína. Meio sólido LB Agar, 30°C. (A) 1 <sup>o</sup> dia de cultivo; (B) 2 <sup>o</sup> dia de cultivo.	92

Figura 5.15	Inibição de violaceína em CV017 (mutante de ATCC 31532) por AHL de cadeia longa.	93
Figura 5.16	Identificação de AHL de cadeia curta a partir da extração do sobrenadante das culturas de <i>C. violaceum</i> e suas mutantes. CVwt: tipo selvagem-ATCC 12472; CVm1, CVm3, e CVmA5: mutantes de ATCC 12472.	94
Figura 5.17	Identificação de AHL de cadeia longa a partir da extração do sobrenadante das culturas de <i>C. violaceum</i> e suas mutantes. CVwt: tipo selvagem ATCC 12472; CVm1, CVm3, e CVmA5: mutantes de ATCC 12472.	95
Figura 5.18	Identificação de AHL de cadeia curta a partir da extração do sobrenadante das culturas mutantes de <i>C. violaceum</i> (CVm3 e CVmA6).	95
Figura 5.19	Identificação de AHL de cadeia longa a partir da extração do sobrenadante das culturas mutantes de <i>C. violaceum</i> (CVm3 e CVmA6).	96
Figura 5.20	Identificação de AHL de cadeia curta a partir da extração do sobrenadante da cultura de CVmB8 (mutante de <i>C. violaceum</i> ).	96
Figura 5.21	Identificação de AHL de cadeia longa a partir da extração do sobrenadante da cultura de CVmB8 (mutante de <i>C. violaceum</i> ).	97
Figura 5.22	Diferença fenotípica entre as linhagens selvagens de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 (placa a esquerda) e ATCC 31532 (placa a direita). (A) 1º dia de cultivo; (B) 2º dia de cultivo (T = 30°C).	98
Figura 5.23	Alinhamento entre os nucleotídeos de <i>cvlI</i> de ATCC 31572 e de ATCC 12472.	101
Figura 5.24	Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos de CviI de ATCC 31572 e de ATCC 12472.	102
Figura 5.25	Domínio da enzima CviI para as linhagens ATCC 12472 e ATCC 31532, de acordo com o resultado Blast-PDB. Os números em azul representam os resíduos de aminoácidos.	102
Figura 5.26	Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos de alguns homólogos de LuxI que sintetizam HHL.	103
Figura 5.27	Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos de alguns homólogos de LuxI que sintetizam OHHL.	104
Figura 5.28	Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos de alguns homólogos de LuxI que sintetizam OdDHL.	104
Figura 5.29	Região de inserção de mini-Tn5 <i>luxCDBAE</i> gerando a mutante CVm1.	107
Figura 5.30	Região de inserção de mini-Tn5 <i>luxCDBAE</i> gerando a mutante CVm3.	107

Figura 5.31	Região de inserção de mini-Tn5 <i>luxCDBAE</i> gerando a mutante CVmA5.	108
Figura 5.32	Região de inserção de mini-Tn5 gerando a mutante CVmA6.	108
Figura 5.33	Região de inserção do mini-Tn5 gerando a mutante CVmB8.	108
Figura 5.34	Modelo hipotético para o controle positivo da produção de violaceína em ATCC 12472.	110
Figura 5.35	Arquitetura da rede regulatória do operon <i>vioABCD</i> em ATCC 12472 utilizando rede de Petri híbrida (Modelo construído com o software <i>Cell Illustrator</i> ).	114
Figura 5.36	Produção de violaceína de acordo com diferentes condições de simulação da rede regulatória. A simulação foi feita através do software <i>Cell Illustrator</i> utilizando-se a arquitetura da rede de Petri híbrida.	119



# Lista de Tabelas

Tabela 3.1	Banco de dados públicos mais utilizados em bioinformática.	38
Tabela 3.2	Programas de alinhamento mais utilizados.	39
Tabela 4.1	Ferramentas de bioinformática utilizadas neste trabalho.	47
Tabela 4.2	Linhagens de bactérias e vetores.	49
Tabela 4.3	Enzimas de restrição e respectivas seqüências de corte.	61
Tabela 4.4	Concentração e volume de AHL padrão utilizado em TLC.	69
Tabela 4.5	Frações de AHL obtidos da coluna HPLC e tempos de retenção.	71
Tabela 5.1	Genes que podem ter como produto o regulador transcricional CRP em ATCC 12472.	87
Tabela 5.2	Teste de resistência a antibióticos para <i>C. violaceum</i> e <i>E.coli</i> em placa de disco.	88
Tabela 5.3	Resistência a antibióticos para <i>C. violaceum</i> e <i>E. coli</i> (meio sólido, placas).	88
Tabela 5.4	Teste de resistência a antibióticos para <i>C. violaceum</i> e <i>E. coli</i> (meio líquido).	89
Tabela 5.5	Produção de diferentes moléculas AHL pelas linhagens de <i>C. violaceum</i> .	99
Tabela 5.6	Proteínas carregadoras do grupo acil (ACP) encontradas como o produto da ORF em <i>C. violaceum</i> .	100
Tabela 5.7	Regiões de regulação da biossíntese de violaceína em <i>C. violaceum</i> .	106
Tabela 5.8	Lugares e variáveis utilizadas na rede de Petri.	116
Tabela 5.9	Propriedades da rede de Petri implementadas para representar semi-quantitativamente o modelo da regulação da biossíntese de violaceína.	117
Tabela 5.10	Arcos utilizados na rede de Petri.	118

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>VI</b>
Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO, E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
2.1 Estratégia de Ação e Objetivos Gerais .....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	7
<b>CAPÍTULO 3 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
3.1 O Genoma Bacteriano .....	8
3.2 Regulação Gênica em Bactérias .....	10
3.2.1 Os Operons.....	11
3.2.2 O Operon da Lactose .....	13
3.2.3 Outros Sistemas de Regulação em Procariotos.....	15
3.3 Mecanismo de Regulação <i>Quorum Sensing</i> .....	18
3.3.1 A Família LuxR de Proteínas Regulatórias da Transcrição .....	22
3.3.2 Família LuxI das Proteínas Homoserina Lactona Sintetases .....	24
3.4 <i>Chromobacterium violaceum</i> - Organismo Modelo.....	28
3.4.1 Biossíntese de Violaceína e sua Regulação .....	30
3.5 O Uso de Mini-Tn5 <i>luxCDABE</i> na Identificação e Monitoramento de Genes-Alvo.....	34
3.6 Estudos Pós-Genômicos e o Uso de Ferramentas de Bioinformática.....	36
3.6.1 Bancos de Dados Públicos.....	37
3.6.2 Ferramentas de Alinhamento de Sequências.....	38
3.6.3 As Redes de Petri em Redes Regulatórias.....	39
<b>CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
4.1 Ferramentas de Bioinformática.....	46

4.2 Cinética de Crescimento e Produção de Violaceína por <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	48
4.2.1 Linhagem da Bactéria.....	48
4.2.2 Ensaio com ATCC 12472 .....	49
4.2.2.1 Preparo dos Inóculos .....	49
4.2.2.2 Cultivo em Meio Líquido.....	50
4.2.2.3 Cultivo em Meio Sólido .....	50
4.2.2.4 Avaliação do Crescimento e Produção de Violaceína .....	50
4.2.2.5 Cromatografia de Camada Delgada .....	51
4.2.2 Influência da Concentração de AHL para Diferentes Fontes de Carbono sobre a Produção de Violaceína por <i>C. violaceum</i> (CV026).....	52
4.3 Estudo da regulação do operon <i>vioABCD</i> através de mutagênese .....	52
4.3.1 Mutação por Transposição.....	53
4.3.2 Construção das Mutantes de <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	54
4.3.2.1 Transformação por Conjugação .....	54
4.3.2.2 Seleção de Colônias Mutadas .....	55
4.3.3 Manipulação de DNA.....	56
4.3.3.1 Extração de DNA Cromossomal .....	56
4.3.3.2 Extração de DNA Plasmideal.....	58
4.3.3.3 Digestão Parcial de DNA Cromossomal .....	59
4.3.3.4 Digestão de DNA Plasmideal .....	60
4.3.3.5 Eletroforese em Gel Agarose dos Fragmentos de DNA.....	61
4.3.3.6 Purificação de Amostras de DNA Plasmideal e Cromossomal .....	62
4.3.3.7 Ligação do DNA Cromossomal e Plasmideal Digeridos.....	62
4.3.4 Clonagem.....	62
4.3.4.1 Transformação por Eletroporação.....	63
4.3.5 Sequenciamento de DNA .....	64
4.3.5.1 Preparação do Molde (Template) .....	64
4.3.5.2 Análise Computacional do DNA Sequenciado .....	65
4.4 Identificação de Moléculas Sinais <i>Quorum Sensing</i> Produzidas por <i>Chromobacterium violaceum</i> e suas Mutantes .....	65
4.4.1 Bioensaio N-AHL .....	65
4.4.1.1 Bioensaio I – Indução de Violaceína .....	65
4.4.1.2 Bioensaio II – Inibição de Violaceína .....	67

4.4.1.3 Bioensaio III– Indução de Bioluminescência.....	67
4.4.1.4 Bioensaio IV – Cromatografia de Camada Delgada.....	68
4.4.1.5 Extração de AHL de <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	70
4.4.1.6 Purificação da Molécula de Indução por HPLC .....	70
<b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1 Análise de CviR e CviI com Base na Homologia entre Sequências .....	72
5.2 Predição da Estrutura 3D da Proteína Regulatória CviR.....	73
5.3 Alinhamento entre a Sequência Modelo e a Sequência de CviR.....	76
5.4 Mecanismo de Regulação do Operon <i>vioABCD</i> .....	76
5.5 Cinética de Crescimento de <i>Chromobacterium violaceum</i> e Produção de Violaceína.....	80
5.6 Influência da Concentração de AHL na Produção de Violaceína em CV026 .....	83
5.7 Seleção de Antibióticos para a Construção das Mutantes de <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	87
5.7 Característica das Mutantes de C. violaceum .....	90
5.8 Identificação de AHL: ATCC 12472 Produz Três Moléculas Indutoras .....	93
5.9 Caracterização dos Clones .....	106
5.10 Arquitetura da Rede de Regulação .....	112
<b>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>121</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE I – ESTOCAGEM DE BACTÉRIAS E PREPARO DE MEIO DE CULTURA.....</b>	<b>124</b>
<b>APÊNDICE II – PREPARO DE SOLUÇÕES .....</b>	<b>127</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>129</b>

# Capítulo 1 - Introdução, Motivação, e Justificativa

*Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica facultativa que vive em regiões quentes, geralmente em solos e rios. No Brasil é encontrada principalmente às margens do Rio Negro, na Amazônia. Escolhida para o seqüenciamento do seu genoma no Projeto Genoma Nacional Brasileiro (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003), esta bactéria destaca-se por apresentar um grande potencial para aplicações biotecnológicas diversas.

*C. violaceum*, assim como muitas outras bactérias Gram-negativas, é capaz de realizar a biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHA's) (Steinbüchel *et al.*, 1993). Estes polímeros são produzidos por algumas bactérias quando cultivadas sob limitação de nitrogênio, sulfato, oxigênio ou fosfato, e abundância de carbono, e apresentam características físico-químicas bastante semelhantes às do polipropileno, de origem petroquímica, com a vantagem de serem biodegradáveis e biocompatíveis. Uma das características mais marcantes da *C. violaceum* é a produção, dentre outros metabólitos, de um pigmento de cor violeta, chamado violaceína, quando cultivada em presença de oxigênio. Embora o papel fisiológico da violaceína para a bactéria seja desconhecido, extratos brutos do pigmento têm demonstrado atividades antibiótica e tripanocida (Caldas *et al.*, 1978; Durán *et al.*, 1994; Antônio *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1999). Após sua caracterização através do seqüenciamento de DNA, quatro genes foram identificados como os responsáveis pela biossíntese da violaceína, constituindo o operon *vioABCD* (Pemberton *et al.*, 1991; August *et al.*, 2000; Brazilian National Genome Project Consortium, 2003). Na década de 90 foram propostos vários compostos intermediários na biossíntese de violaceína, como o ácido cromopirrólico, a proviolaceína, a prodesoxiviolaceína, além de rearranjos intramoleculares do anel indólico do lado do 5-hidroxiindol para a formação da molécula de violaceína (Momen e Hoshino, 2000), e das enzimas envolvidas (VioA, VioB, VioC e VioD) nas etapas da via biossintética (August *et al.*, 2000). Estes últimos trabalhos propõem um esquema para a biossíntese da violaceína, mas ainda não são bem entendidos os fatores que regulam a produção de violaceína, nem sua função fisiológica em *C. violaceum*.

Dados da anotação do genoma dessa bactéria mostram também que a mesma possui dois genes relacionados ao *quorum sensing* (*cviR* e *cviI*), um sistema de sinalização celular

característico em bactérias, principalmente em Gram-negativas. O termo *quorum sensing* foi utilizado pela primeira vez em um trabalho de Fuqua e colaboradores em 1994 e é entendido como um sistema de regulação (auto indução) capaz de controlar a densidade populacional dos microrganismos e outras variáveis de caráter fisiológico por meio de uma sinalização molecular intercelular. Da literatura (McClellan *et al.*, 1997; Blosser e Gray, 2000) sabe-se que a produção de violaceína é induzida pela presença de moléculas-sinais, as quais caracterizam o fenômeno *quorum sensing*. Este tipo de sinalização celular é influenciado por flutuações ambientais, tais como diferenças de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e outros. Nas bactérias Gram-negativas, a molécula sinalizadora pertence à família das N-acil homoserina lactonas (AHL). Estas moléculas (AHL) controlam a expressão de diversas funções fisiológicas de várias bactérias (Whitehead *et al.*, 2001). Em *C. violaceum* (linhagem ATCC 31532), a molécula de sinalização identificada foi a N-hexanoil-L-homoserina lactona, cuja síntese é catalisada pela enzima CviI (McClellan *et al.*, 1997).

Neste trabalho serão identificados genes e regiões de regulação que controlam a biossíntese de violaceína (operon *vioABCD*), e a regulação *quorum sensing* na linhagem ATCC 12472 (caracterizada pelo seqüenciamento de DNA) serão exploradas. Partindo-se de uma análise dos genes da *C. violaceum* e com base na homologia funcional da proteína regulatória CviR (da família LuxR), construiu-se uma analogia com o sistema de regulação do genótipo da bioluminescência em *Vibrio fischeri* (Engrebrecht e Silverman, 1984).

Regiões de regulação que detêm o controle da produção de violaceína serão identificados através da inserção aleatória de transposon (mini-Tn5) no genoma de *C. violaceum*. Os genes responsáveis pela regulação *quorum sensing* em ATCC 12472 também serão explorados e as moléculas de indução serão identificadas.

O propósito deste trabalho é de seguir uma linha de estudo pós-genoma, explorando também a funcionalidade dos genes, o que dá continuidade aos interesses que levaram *C. violaceum* a ser seqüenciada no projeto Genoma Nacional Brasileiro. Os resultados obtidos a partir das informações genômica e experimental podem contribuir para eventuais melhorias na produtividade de metabólitos que despertem interesse biotecnológico como, por exemplo, a violaceína e derivados da mesma via biossintética.

# Capítulo 2 - Objetivos

## 2.1 Estratégia de Ação e Objetivos Gerais

Este trabalho busca dar sua contribuição científica dentro dos interesses que levaram a *Chromobacterium violaceum* a ter o seu genoma seqüenciado no Projeto Genoma Nacional Brasileiro, seguindo uma etapa de estudos pós-genoma. Neste trabalho de tese de doutorado propõe-se investigar aspectos funcionais e de regulação de genes responsáveis pela biossíntese de violaceína e derivados da mesma via.

O problema de modelagem e simulação de vias (ou redes) metabólicas tem sido amplo objeto de investigação de vários pesquisadores nos últimos anos. O problema regulatório, no entanto, é mais complexo, e exige maior conhecimento biológico.

É conhecido na literatura (Taylor, 1997; McClean *et al.*, 1997; Blosser e Gray, 2000) que a produção de violaceína em *C. violaceum* é induzida pela presença de moléculas responsáveis pelo sistema *quorum sensing*, capaz de controlar a densidade populacional de microorganismos e outras variáveis de caráter fisiológico por meio de uma sinalização molecular intercelular. Utilizando a informação genômica desta bactéria e fazendo-se uso de técnicas experimentais de biologia molecular, pretende-se responder as seguintes perguntas: Existem outros genes envolvidos na regulação da violaceína, além dos genes responsáveis pelo *quorum sensing* e operon *vioABCD*? Quais são estes genes? Para isto, o trabalho partiu de uma análise dos dados de sequenciamento do genoma de *C. violaceum*, investigando as ORFs (*opened read frames* ou quadros abertos de leitura) que correspondem aos genes de interesse e sua vizinhança, utilizando ferramentas de bioinformática. Definida a melhor estratégia para o estudo teórico, partiu-se destes resultados para a definição de estratégias experimentais de biologia molecular, que pudessem complementar o estudo teórico.

## 2.2 Objetivos Específicos

Entre os objetivos específicos deste trabalho pretende-se:

- Obter mutantes a partir da linhagem selvagem de *Chromobacterium violaceum* (ATCC 12472); que possam ser utilizadas no estudo de genes regulatórios;
- Identificar algumas regiões de regulação a nível transcricional e os agentes (moléculas de sinalização ou proteínas) responsáveis pela regulação da produção de violaceína em *C. violaceum* (linhagem ATCC 12472);
- Explorar as moléculas de sinalização responsáveis pelo mecanismo *quorum sensing* na linhagem de *C. violaceum* ATCC 12472.
- Construir um modelo da arquitetura da rede de regulação da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de violaceína baseada no mecanismo de sinalização *quorum sensing*, utilizando redes de Petri híbrida.



# Capítulo 3 - Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica

## 3.1 O Genoma Bacteriano

As estruturas nas quais se distribui o genoma bacteriano são denominadas de elementos genéticos, sendo classificados em cromossomo, plasmídios, elementos transponíveis e bacteriófagos. Na grande maioria das bactérias, existe apenas um cromossomo (as bactérias são, portanto, haplóides), formado por uma única molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) circular de fita dupla. Em condições normais, este DNA está compactado na região central da célula. Em bactérias, o DNA cromossomal não está associado a histonas (proteínas que compactam a fita de DNA), como no caso do DNA humano, mas existem algumas proteínas que impedem a sua distensão. A compactação da molécula de DNA bacteriano é dependente destas proteínas e do enovelamento interno que ocorre na cadeia circular, um arranjo designado de *circular covalently closed* (CCC) (Cooper, 2000).

No cromossomo bacteriano situam-se todos os genes essenciais para o metabolismo, sobrevivência e reprodução da célula bacteriana. Os plasmídios, moléculas menores, são também formados por DNA circular de fita dupla. Porém, existem bactérias que apresentam tanto cromossomo como plasmídios formados por DNA lineares. Os plasmídios apresentam um tamanho molecular bem inferior ao do cromossomo. No entanto, são capazes de se autoreplicarem independentemente (Mathews *et al.*, 2000).

Os genes existentes nos plasmídios apenas conferem vantagens adaptativas para as bactérias, não sendo essenciais para a sua sobrevivência. Entretanto, existem genes cromossomais cujo funcionamento está sujeito à regulação de genes plasmidiais, e vice-versa. Os plasmídios podem ser classificados de acordo com o caráter fenotípico que conferem à bactéria ou quanto à possibilidade de serem transferidos de uma célula bacteriana para a outra (Berg *et al.*, 2002).

Quanto ao caráter fenotípico, os plasmídios podem ser classificados em várias categorias como, por exemplo, (a) fatores de resistência: plasmídios que conferem capacidade

de resistir a drogas, como antibióticos e metais pesados; (b) plasmídios metabólicos: que permitem à bactéria aproveitar alguns substratos pelo fato de apresentarem genes das enzimas necessárias para realizar tal função; (c) plasmídios de virulência: plasmídios que apresentam genes que codificam fatores de virulência, o que torna a bactéria um patógeno em potencial (Mathews *et al.*, 2000).

Quanto à possibilidade de serem transferidos de uma bactéria para outra, os plasmídios são classificados em conjugativos e não conjugativos. Plasmídios conjugativos são aqueles que são capazes de se autotransferir de uma célula bacteriana para outra. Os não conjugativos não apresentam esta propriedade. Os plasmídios conjugativos são também chamados fatores F (F significando *fertilidade*) e apresentam uma sequência particular de bases, chamada de região de transferência, ou região *tra*. É na região *tra* que se situam os genes que regulam a transferência dos plasmídios conjugativos (Griffiths *et al.*, 1999).

Diferentemente do cromossomo e plasmídios, os elementos transponíveis são formados por DNA linear de fita dupla e são incapazes de replicarem-se independentemente. Por isto, normalmente estão integrados no cromossomo ou nos plasmídios, de cuja replicação dependem para aumentar seu número de cópias. A característica peculiar dos elementos transponíveis é a capacidade de deslocarem-se de um ponto para o outro no plasmídio ou cromossomo. São também capazes de passarem de um plasmídio para o outro ou destes para o cromossomo, e vice-versa. Por causa desta propriedade, são também designados de genes saltatórios. Quando integram-se em um ponto do DNA bacteriano (plasmídio ou cromossomo), podem provocar alterações nos genes adjacentes, levando à sua ativação ou inativação. Os elementos transponíveis são classificados em duas categorias: sequências de inserção e transposons. As sequências de inserção são apenas sequências de DNA que se integram em diferentes pontos do genoma, provocando ou não modificação na função gênica. Já os transposons, além de terem estas propriedades, são portadores de genes que podem conferir algum caráter fenotípico às bactérias, como por exemplo, resistência a antibióticos (Cooper *et al.*, 2000).

Além das já mencionadas, outras características dos elementos transponíveis são: (a) presença de sequências de bases repetidas e invertidas nas extremidades, (b) apresentam um gene que codifica a enzima transposase (enzima esta que determina sua mobilização), e (c) possuem um sítio que regula a função de transposição.

Os bacteriófagos são partículas virais que infectam bactérias e cujo DNA eventualmente pode fazer parte do genoma destas. Da mesma forma que os transposons, os

bacteriófagos podem ser portadores de genes que conferem algumas características às bactérias hospedeiras (Griffiths *et al.*, 1999).

Uma das particularidades do genoma bacteriano é que freqüentemente os genes organizam-se em operons, ou seja, em grupos sujeitos a uma mesma seqüência promotora, portanto sob a mesma regulação. Os genes que fazem parte dos operons codificam para funções relacionadas.

### 3.2 Regulação Gênica em Bactérias

As características fenotípicas de uma bactéria são determinadas pelo seu genótipo e por certas condições ambientais. Embora as bactérias tenham distribuição mundial e sejam encontradas nas mais diversas condições ambientais do planeta, cada grupo bacteriano está adaptado a condições ambientais restritas que proporcionam condições ideais de crescimento, e permitem um potencial máximo de sobrevivência. Ainda assim, as bactérias estão expostas a uma ampla gama de alterações nas condições ambientais envolvendo temperatura, pH, concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, compostos tóxicos, etc. Alterações nas condições ambientais requerem pronta adaptação para assegurar a sobrevivência da população. Para se adaptar, a bactéria deve produzir algum componente estrutural ou funcional que lhe assegure a sobrevivência em novas condições ambientais. A produção de novos componentes requer a expressão de genes que antes não estavam se expressando (isto é, sendo transcritos), porque até então seus produtos não eram necessários à sobrevivência da célula.

Os genes de uma bactéria atual evoluíram para conferir o máximo de sobrevivência em um determinado ambiente (nicho). Produtos gênicos essenciais são sintetizados em quantidades que permitem o mais rápido crescimento possível dentro de uma dada condição ambiental. Produtos gênicos requeridos sob circunstâncias especiais são sintetizados apenas quando necessários. Se, no meio onde a bactéria se encontra há a presença de moléculas orgânicas essenciais para seu crescimento, esta não irá sintetizá-las a partir de precursores também presentes no meio, e este fato atende ao princípio da economia de energia da célula. Do ponto de vista energético, a síntese de compostos orgânicos requer processos altamente dispendiosos para a célula. Portanto, regular os tipos e quantidades de compostos que serão

sintetizados é muito efetivo para a otimização do crescimento de uma população bacteriana (Berg *et al.*, 2002).

A adaptação fisiológica envolve a síntese de enzimas especificamente requeridas para a adaptação a uma determinada condição ambiental. A síntese de enzimas específicas como resposta a uma nova condição envolve a expressão de genes específicos, o que por sua vez, requer a existência de mecanismos de regulação gênica.

A regulação pode afetar qualquer passo da expressão gênica, incluindo o início ou término da transcrição, a tradução, ou a atividade dos produtos gênicos. A regulação gênica envolve um grupo de genes de um processo metabólico particular tais como o aproveitamento de um determinado açúcar como fonte de carbono ou a síntese de um determinado aminoácido (Cooper *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 1998).

A pergunta-chave que antecede qualquer sistema de regulação da expressão gênica é: como os genes são ligados ou desligados, ou como são induzidos ou reprimidos? Existem duas categorias de regulação gênica: a indução da expressão gênica e a repressão da expressão gênica. A indução da expressão de um ou mais genes resulta na síntese de enzimas cujos substratos se tornaram presentes em uma célula. Por outro lado, a repressão da expressão gênica impede que uma ou mais enzimas continuem a ser produzidas porque os produtos da atividade enzimática atingiram uma concentração ideal ou limite na célula.

A indução da expressão geralmente resulta na síntese de enzimas catabólicas em resposta à presença, no meio, de um substrato para uma determinada via metabólica, enquanto que a síntese de enzimas biossintéticas é reprimida pelo produto final de uma via metabólica. Dentro dessas duas categorias de regulação gênica existem vários mecanismos reguladores e que vão determinar se um produto gênico em particular será ou não sintetizado.

### 3.2.1 Os Operons

Nas bactérias, os genes que codificam enzimas que participam de uma via metabólica particular freqüentemente ocupam posições contíguas no cromossomo bacteriano formando “blocos gênicos” denominados operons. Um operon é constituído por genes que codificam a síntese de proteínas denominados genes estruturais, antecidos por uma sequência de nucleotídeos que funciona como uma região que regula a expressão do operon. Esta região - denominada promotor, não codifica proteína e funciona como sítio de ligação

da enzima RNA polimerase que catalisa a transcrição dos genes estruturais do operon. Os genes de um operon são transcritos como uma única molécula de RNA mensageiro denominada RNA mensageiro policistrônico. Após a transcrição, o mRNA policistrônico é processado para produzir as moléculas de mRNA particulares para cada proteína dos genes do operon. Desta forma, cada produto gênico é traduzido como uma molécula independente (Cooper *et al.*, 2000).

Os genes de um operon são coordenadamente induzidos ou reprimidos e, portanto, a organização em operons constitui uma estratégia importante para a regulação coordenada dos genes que participam de uma mesma via metabólica.

O promotor do operon também serve como sítio de ligação de proteínas reguladoras específicas que reprimem ou induzem a expressão dos genes estruturais do operon. Proteínas repressoras reprimem a expressão dos genes estruturais de um operon por se ligarem próximo ao sítio de ligação da RNA polimerase, impedindo que esta se associe ao promotor e promova a transcrição dos genes estruturais. Proteínas indutoras induzem a expressão dos genes estruturais de um operon por se ligarem próximo ao sítio de ligação da RNA polimerase, estabilizando a ligação dessa enzima ao promotor, de forma que esta possa iniciar a transcrição dos genes estruturais. As proteínas reguladoras são codificadas por genes distintos daqueles do operon, e geralmente estão localizados em outros pontos do cromossomo bacteriano (Griffiths *et al.*, 1999).

Um operon que pode ser induzido está sempre reprimido e seus genes não se expressam a menos que os substratos para as enzimas que esses genes codificam estejam presentes na célula. Por outro lado, os genes de um operon que podem ser reprimidos estão sempre se expressando e promovendo a síntese das enzimas de uma via metabólica até que os produtos da atividade enzimática tenham atingido uma concentração ideal na célula, quer através da sua síntese a partir de precursores presentes na célula, ou pela entrada, a partir do meio, desse produto pré-formado (Berg *et al.*, 2002).

A expressão dos genes de uma bactéria está diretamente relacionada às condições ambientais às quais a população se encontra. A concentração de uma determinada proteína em uma célula pode variar de nenhuma a milhares de moléculas. Isto é determinado pela ação combinada de vários mecanismos reguladores que afetam a expressão do gene estrutural da proteína. A regulação específica induz ou reprime a expressão de um gene particular ou de um operon; a regulação global determina respostas da bactéria a nutrientes básicos tais como carbono, nitrogênio ou fósforo, reações ao estresse, tais como danos ao DNA ou choque

térmico, ou síntese de fatores de virulência por patógenos durante o crescimento em seus hospedeiros.

### 3.2.2 O Operon da Lactose

O modelo de operon foi primeiramente proposto por Jacob e colaboradores em 1960 e, como já discutido no item anterior, representa um conjunto de genes estruturais, precedidos por uma mesma região reguladora que controla a transcrição dos genes. No genoma de *Escherichia coli*, os genes que controlam o metabolismo da lactose encontram-se organizados em um operon denominado operon *lac*, que é constituído por três genes estruturais precedidos por uma região reguladora que controla a transcrição dos genes estruturais do operon (Beckwith, 1967) (Figura 3.1). Uma vez demonstrado que estes genes estão sob uma mesma região promotora, o operon da lactose passou a servir como um modelo de regulação gênica.

<b>R</b>	<b>P</b>	<b>O</b>	<b><i>lacZ</i></b>	<b><i>lacY</i></b>	<b><i>lacA</i></b>
----------	----------	----------	--------------------	--------------------	--------------------

Figura 3.1 Organização do operon da lactose em *Escherichia coli*. Gene repressor (R): gene estrutural que codifica a síntese da proteína repressora do operon *lac*; Promotor (P): região do DNA que funciona como sítio de ligação da RNA polimerase; operador (O): região do DNA que funciona como sítio de ligação da proteína repressora do operon *lac*; gene *lacZ*: gene estrutural que codifica a síntese da enzima  $\beta$ -galactosidase; gene *lacY*: gene estrutural que codifica a síntese da proteína de transporte  $\beta$ -galactosídeo-permease associada à membrana plasmática; gene *lacA*: gene estrutural que codifica a síntese da enzima transacetilase, responsável pela eliminação dos galactosídeos não hidrolisados.

A lactose é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma molécula de galactose. Este açúcar pode servir como fonte de carbono e energia para as bactérias. Para tanto, esse dissacarídeo deve poder penetrar na célula e ser quebrado nos seus monossacarídeos constituintes. Os genes estruturais são contíguos e organizados na seguinte ordem: *lacZ*, *lacY* e *lacA*. O gene *lacZ* codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase que quebra a lactose em glicose e galactose. O gene *lacY* codifica a enzima  $\beta$ -galactosídeo-permease que se associa à membrana plasmática da bactéria e funciona como uma proteína de transporte que carrega a lactose do meio para o citoplasma da célula. O gene *lacA* codifica a síntese da enzima

transacetilase, responsável pela eliminação dos galactosídeos não hidrolisados (Berg *et al.*, 2002).

A região reguladora é constituída pelo promotor que funciona como sítio de ligação da RNA polimerase e por uma curta seqüência de nucleotídeos denominada operador que funciona como sítio de ligação da proteína reguladora da expressão do operon (Jacob *et al.*, 1964).

Na ausência de lactose no meio de crescimento da bactéria, o operador está sempre associado com a proteína repressora. Essa proteína é codificada pelo gene R, denominada de gene repressor. A proteína repressora impede a enzima RNA polimerase de transcrever os genes estruturais. Se houver a entrada de lactose na célula, uma molécula deste açúcar se liga à proteína repressora associada ao operador, alterando sua conformação espacial e provocando sua dissociação do operador. Com o operador desimpedido, a RNA polimerase pode efetuar a transcrição dos genes estruturais do operon. A transcrição é feita na forma de mRNA policistrônico que é processado para produzir as moléculas de mRNA particulares para cada uma das três enzimas codificadas pelos genes do operon. Desta forma, cada mRNA é traduzido em uma proteína independente, resultando na síntese das três enzimas envolvidas no aproveitamento da lactose (Berg *et al.*, 2002).

Algumas moléculas de lactose presentes na célula ligam-se às proteínas repressoras do operon *lac* que estiverem presentes na célula, impedindo que se liguem ao operador do operon, desta forma garantindo a expressão de seus genes e a síntese das enzimas necessárias para a entrada e quebra da lactose em glicose e galactose (Mathew *et al.*, 2002).

Enquanto houver disponibilidade de lactose na célula todas as moléculas da proteína repressora que forem sintetizadas pelo gene R serão inativadas pela lactose. Quando os níveis de lactose se tornam muito baixos, as moléculas de lactose associadas aos repressores são metabolizadas pela  $\beta$ -galactosidase, e os repressores são liberados. Um repressor ativo associa-se ao operador, bloqueando a ação da RNA polimerase e reprimindo a expressão do operon. Desse modo, a síntese das três enzimas envolvidas no metabolismo da lactose, agora desnecessárias, deixa de ocorrer.

Quando a bactéria *E. coli* é cultivada em presença de glicose e lactose, a expressão do operon *lac* permanece inibida até que a lactose seja exaurida. A repressão do operon *lac* pela glicose é denominada repressão pelo catabólito, e é o resultado dos baixos níveis de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) intracelular, característico de células crescendo com suprimento adequado de glicose (De Crombrughe *et al.*, 1971; Simpson, 1980); quando o

nível de glicose cai, os níveis de cAMP aumentam e, simultaneamente, os galactosídeos induzem o sistema ligando-se ao repressor. Em consequência, o promotor é liberado, permitindo a ligação da RNA polimerase. O cAMP interage com a proteína CRP (cAMP receptor protein), também denominada CAP (*catabolite activator protein*). O complexo cAMP/CAP, na forma de um dímero, tem afinidade por uma sequência próxima ao promotor, à montante da região onde a RNA polimerase se liga. A ligação do complexo facilita a ligação da RNA polimerase, aumentando em 50 vezes sua atividade (Reznikoff, 1992) (Figura 3.2).

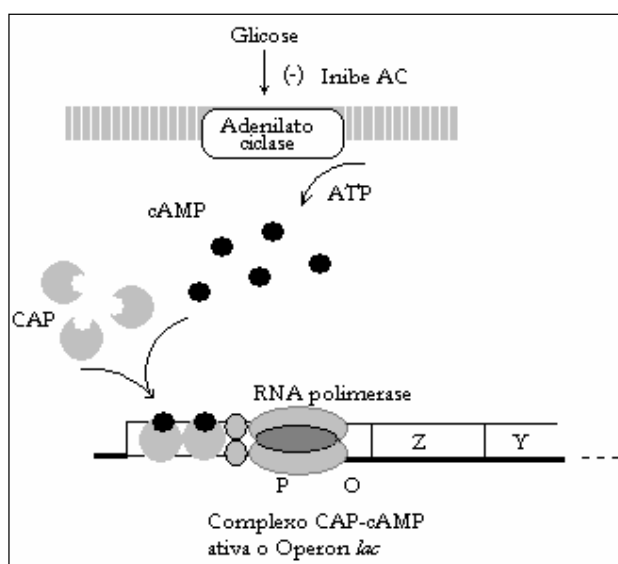


Figura 3.2 Atuação do complexo cAMP-CAP no operon *lac*. A glicose inibe a atividade da adenilato ciclase (AC), a qual sintetiza cAMP a partir de ATP. Em consequência, a concentração de cAMP diminui dentro da célula, não ativando eficientemente o fator de transcrição CAP. O complexo CAP-cAMP é um ativador do operon *lac*; sem ele, a transcrição é bastante ineficiente porque o promotor *lac* é um promotor fraco, ou seja, um promotor pelo qual a RNA polimerase tem baixa afinidade.

### 3.2.3 Outros Sistemas de Regulação em Procariotos

A seguir serão abordados outros sistemas de regulação transcricional em organismos procarióticos, descritos após a elucidação do sistema de regulação do operon *lac*.



### • Operon Triptofano: Um Repressor

Outro exemplo de regulação da expressão gênica é a repressão do aminoácido triptofano. As bactérias regulam a transcrição dos genes da síntese do triptofano quando os níveis de triptofano são baixos na célula; por outro lado, se a quantidade de triptofano no meio celular for elevada, seria um desperdício de energia sintetizá-lo. Neste caso, o controle é realizado pela repressão do próprio triptofano (Trp), que se liga ao operon *trp*, o qual contém os genes da via de biossíntese do Trp (Figura 3.3).

Quando há altos níveis de Trp no meio celular, a molécula de triptofano se liga ao repressor e induz uma mudança conformacional na molécula repressora, que por sua vez passa a interagir com o DNA. Por outro lado, quando há baixos níveis de Trp no meio celular, o mesmo não se liga à molécula repressora, que permanece na sua conformação original, incapaz de se acoplar ao DNA. Desta forma, o operador fica livre para que a RNA polimerase proceda na transcrição dos genes da biossíntese de Trp (Matsushiro *et al.*, 1965; Imamoto, 1968).

A biossíntese e regulação do triptofano é importante para a produção de violaceína, visto ser este aminoácido um intermediário chave da biossíntese deste pigmento.

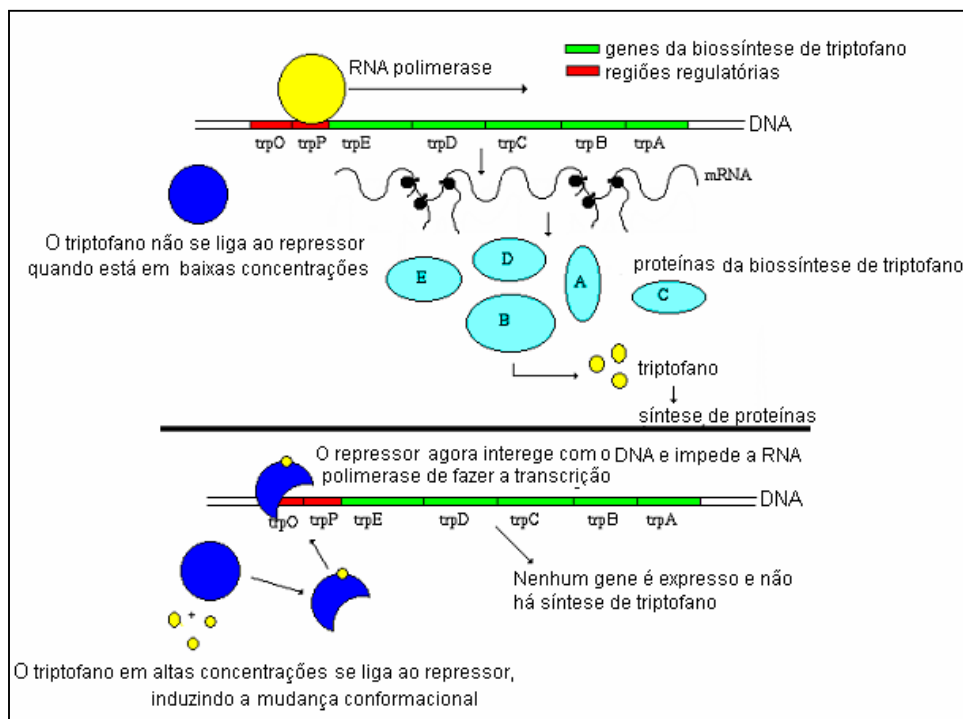


Figura 3.3 Modelo da repressão da síntese de triptofano (Adaptado de <http://www.botany.uwc.ac.za/mirrors/MIT-bio/bio/pge/pgeother.html>).

### • Operon Histidina: Um Atenuador

O controle do operon histidina ocorre de uma forma diferente dos modelos descritos anteriormente. No início do operon há uma região líder, cuja sequência de aminoácidos, dada abaixo, corresponde ao seguinte código de nucleotídeos:

AUG-AAA-CGC-GUU-CAA-UUU-AAA-CAC-CAC-CAU-CAU-CAC-CAU-CAU-CCU-GAC  
Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp

Após a transcrição, os ribossomos iniciam a tradução a partir do mRNA. Entretanto, se houver pouca histidina na célula, o ribossomo perde a sua atividade temporariamente porque não há nenhum aminoacil tRNA carregando histidina. Isto deixa um longo estiramento na molécula de mRNA (pelo fato da RNA polimerase estar ainda realizando a transcrição) sem nenhum ribossomo ligado a ela. A sequência desta molécula de mRNA forma um laço terminador quando os ribossomos se ligam à molécula onde, neste ponto, a molécula de mRNA é clivada, e a RNA polimerase pára de transcrever os genes. Então, o terminador funciona somente quando houver suficiente histidina na célula. O local no qual se forma um laço terminador (*loop*) é chamado de sítio atenuador (Roth *et al.*, 1966; Artz e Broach, 1975). Um esquema da regulação da histidina é mostrado na Figura 3.4.

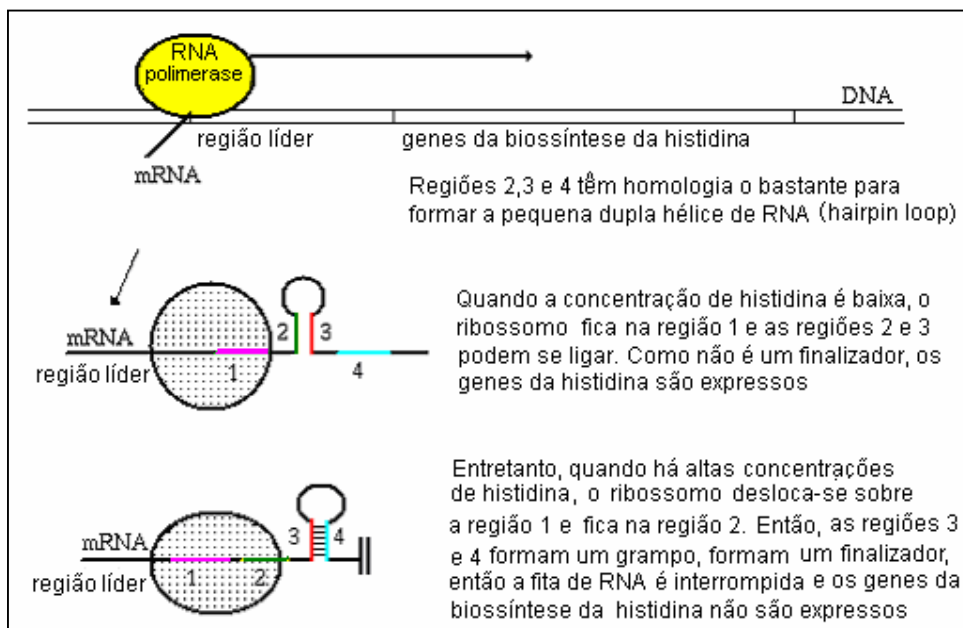


Figura 3.4 Controle do operon histidina (Adaptado de <http://www.botany.uwc.ac.za/mirrors/MIT-bio/bio/pge/pgeother.html>).

- **Quorum Sensing: Um Ativador**

O *quorum sensing* é um tipo de mecanismo de regulação da expressão gênica que se dá através de sinalização celular, comum na maioria das bactérias Gram-negativas. Muitos genes são ativados sob o controle deste sistema de sinalização. No item a seguir será abordada mais detalhadamente a regulação da expressão gênica pelo mecanismo *quorum sensing*, por este sistema de regulação estar presente na *C. violaceum* e ser um dos mecanismos de regulação da expressão do operon *vioABCD*, envolvido na etapa final da síntese de violaceína.

### 3.3 Mecanismo de Regulação *Quorum Sensing*

O *quorum sensing* é um sistema complexo de comunicação celular, comum em bactérias Gram-negativas. A sinalização é intercelular e se dá por um sinal molecular. A molécula de sinalização tem um baixo peso molecular e sua concentração extracelular está relacionada com a densidade populacional de bactérias.

A sinalização se dá em função das flutuações ambientais, tais como diferenças de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e outras. Este fenômeno ocorre porque as bactérias têm desenvolvido múltiplos sistemas que permitem a sua adaptação ao meio ambiente. Existe uma extensa gama de microrganismos que tem a capacidade de perceber e responder à presença de populações vizinhas (Whitehead *et al.*, 2001).

Existem duas categorias principais de moléculas que desempenham o papel de sinalizadores:

- Aminoácidos e curtas cadeias peptídicas, que são comuns em bactérias Gram-positivas;
- Derivados de ácidos graxos, usualmente em bactérias Gram-negativas.

Nas bactérias Gram-negativas, a molécula sinalizadora é uma N-acil homoserina lactona (AHL). Estas moléculas controlam a expressão de diversas funções fisiológicas da bactéria. Esta forma de regulação integrada de uma densidade populacional é comumente

conhecida como *quorum sensing*. Este termo foi utilizado pela primeira vez em um trabalho de revisão de Fuqua e colaboradores (1994).

O primeiro fenótipo no qual a via de regulação do sistema *quorum-sensing* foi identificado foi para a bioluminescência da *Vibrio fischeri*. Esta bactéria vive em simbiose com algumas espécies de peixes e de lulas. O exemplo mais estudado desta simbiose é entre a *V. fischeri* e a *Euprymna scolopes* (Ruby, 1999; Visick e MacFall-Ngai, 2000). Esta pequena espécie de lula vive nas superfícies rasas de areias e corais no arquipélago do Havaí e tem hábito de alimentação noturna. A *E. scolopes* apresenta uma bioluminescência em ambientes escuros devido à presença de uma alta densidade populacional de *V. fischeri* ( $10^{10} - 10^{11}$  células por mL) em um órgão especializado. Tem sido demonstrado que a *V. fischeri* produz coletivamente uma concentração efetiva de no mínimo 100 nM de N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL), quando em alta densidade populacional no órgão especializado da lula (Boettcher e Ruby, 1995). A molécula de OHHL é responsável pela sinalização *quorum sensing* em *V. fischeri*.

O fenótipo de bioluminescência da *V. fischeri* é utilizado pela lula *E. scolopes* a fim de executar um fenômeno de ação chamado “*counter illumination*”. À noite a lula se camufla de seus predadores, que residem abaixo dela, pelo controle da intensidade de luz que se projeta para baixo, eliminando a sombra visível gerada pela luminosidade da lua. Em troca, o *E. scolopes* disponibiliza nutrientes para a população de *V. fischeri* simbiote.

O *cluster* gênico responsável pela bioluminescência nesta bactéria é composto por 8 genes da família *lux* (*luxA-E*, *luxG*, *luxI* e *luxR*), e a transcrição se dá bidirecionalmente (Figura 3.5). Os produtos dos genes *luxI* e *luxR* têm como função a regulação da bioluminescência. Neste caso, OHHL é a molécula sinal que ativa o sistema de regulação. A OHHL se liga à proteína LuxR (expressão do gene *luxR*) que se acopla ao DNA e estimula a transcrição do operon *luxICDABEG*. Quando a densidade celular é alta, uma maior concentração de moléculas de OHHL é produzida, e maior é o estímulo para a transcrição dos genes responsáveis pela bioluminescência. Acredita-se que o estímulo ocorre quando a OHHL se liga à LuxR e ativa a proteína, provavelmente por uma mudança conformacional, como proposto em alguns trabalhos (Qin *et al.*, 2000; Zhu e Winans, 2001), onde estudos foram realizados com um homólogo de LuxR, a proteína regulatória TraR da *Agrobacterium tumefaciens*. A LuxR se liga então a um elemento de DNA de vinte pares de base (20 pb), a *lux* box, que fica 40 pb acima do sítio de início da transcrição do *luxI* (Egland e Greenberg, 1999). Portanto, a intensidade da luminosidade é controlada pela presença de moléculas de

OHHL no meio intra e intercelular. Mesmo em baixas concentrações de OHHL (10 nM) a bioluminescência já é ativada (Engebrecht e Silverman, 1984; Kaplan e Greenberg, 1985). O mecanismo de auto-indução não é iniciado até que seja atingida uma certa densidade celular.

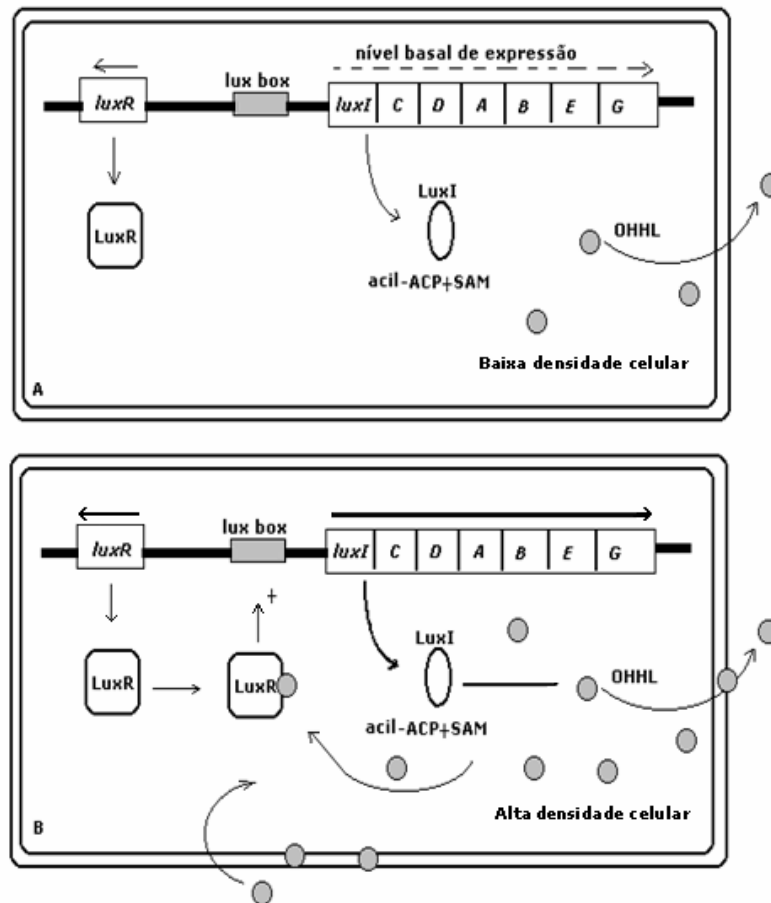


Figura 3.5 Regulação da bioluminescência em *V. fischeri*. A: Em baixa densidade celular, a transcrição dos genes para a bioluminescência (*luxICDABEG*) é fraca e insuficiente para uma alta emissão de luz devido a baixos níveis de OHHL. B: Em alta densidade celular, uma concentração crítica de OHHL é atingida. A OHHL se liga à LuxR e estimula a transcrição do operon *luxICDABEG*, levando a uma rápida amplificação do sinal OHHL e emissão de luz (Adaptado de Whitehead, 2001).

Dunlap e Greenberg, em 1988, demonstraram que em *V. fischeri* a proteína receptora de cAMP (CRP ou CAP) ativa a expressão de *luxR*, induzindo a bioluminescência. As células individuais da *V. fischeri* evitam consumir a considerável quantidade de energia requerida para a emissão de luminosidade, quando não associadas ao hospedeiro. Neste caso, para modular a bioluminescência, a molécula de sinalização, que tem sido identificada como N-octanoil-L-homoserina lactona (OHL), se liga à LuxR (proteína) quando há baixa densidade populacional de *V. fischeri* (Kuo *et al.*, 1994). Esta modulação da luminosidade pode ocorrer pela competição entre moléculas de OHL e de OHHL para se ligar à LuxR. A molécula de OHL inibe a indução prematura da bioluminescência em estágio precoce de crescimento. O gene que expressa a molécula de OHL na *V. fischeri* é o *ainS* (Kuo *et al.*, 1994; Gilson *et al.*, 1995). O seu produto, a proteína AinS, não compartilha identidade da sua seqüência com LuxI, e acredita-se constituir um membro de um segundo grupo de proteínas sintetases de AHL.

Em meados de 1980, os componentes centrais do sistema de regulação do *quorum sensing* foram identificados, e um mecanismo molecular foi proposto para a *V. fischeri*. Além disso, os pesquisadores acreditavam que todo o processo era apenas uma forma interessante de regulação dos genes existentes em espécies de bactérias marinhas. No início dos anos 90, grupos independentes de pesquisa começaram a descobrir mais sobre os sistemas de regulação de várias outras bactérias Gram-negativas, que eram homólogos ao sistema LuxRI da *V. fischeri*. (Whitehead *et al.*, 2001). Estes sistemas utilizam proteínas que compartilham similaridade das seqüências com as seqüências do LuxRI e produzem moléculas que pertencem à mesma classe química das OHHL.

De fato, hoje há mais de 100 homologias das seqüências LuxR e LuxI de múltiplos organismos nos bancos de dados de seqüências, entre eles também os produtos dos genes *cviR* e *cviI* (CviR e CviI), encontrados no genoma da *C. violaceum*, reponsáveis pela sinalização *quorum sensing* nesta bactéria. Acredita-se que estas proteínas estejam associadas à regulação *quorum sensing* de múltiplas funções fisiológicas da *C. violaceum*, além do controle da biossíntese de violaceína e elastase (Taylor, 1997).

### 3.3.1 A Família LuxR de Proteínas Regulatórias da Transcrição

A proteína LuxR é um polipeptídeo de 250 aminoácidos. A presença molecular de chaperonas GroESL proporciona à proteína uma dobradura que confere à mesma uma conformação ativa. Na sua ausência, a LuxR é instável (Adar *et al.*, 1992; Dolan e Greenberg, 1992). Esta proteína se localiza na face citoplasmática da membrana interna e sua função molecular foi estudada primeiramente a partir de experimentos que envolviam deleção ou alteração de um aminoácido na proteína. Há um conjunto de proteínas regulatórias análogas à LuxR, que constituem a chamada família LuxR. Estes estudos mostraram que a família LuxR deriva de um polipeptídeo modular, isto é, pode, por exemplo, dimerizar-se (Kolibachuk e Greenberg, 1993).

Acredita-se que a região N-terminal da família LuxR atue como um sítio de ligação para o grupo acil da molécula de homoserina. Esta hipótese é sustentada a partir da observação de que modificando os aminoácidos desta região, a LuxR dá origem a uma proteína mutante que requer alta concentração de OHHL para a indução da bioluminescência, quando comparada à proteína natural (Slock *et al.*, 1990).

Surpreendentemente, poucos estudos têm sido realizados para validar a proposta original de que existe uma interação direta entre a proteína LuxR e as moléculas acil-homoserinas lactonas. Mas dois trabalhos que reportam estudos realizados com um homólogo de LuxR em outro organismo têm apresentado maior sucesso na validação desta idéia. Zhu e Winams, em 1999, e Qin e colaboradores, em 2000, purificaram a proteína TraR com o seu ligante (molécula de homoserina lactona), demonstrando a atividade da proteína regulatória TraR quando ligada à molécula indutora. TraR é uma proteína regulatória encontrada na bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria possui habilidade em transferir fragmentos de DNA oncogênico resultando em crescimento de tumores em um tipo de planta, chamada de *Datura stramonium*. A origem dos fragmentos de DNA oncogênico se dá em um megaplasmídeo, chamado de plasmídeo indutor de tumor (Ti). Os plasmídeos Ti são capazes de transferir DNA conjugal entre a agrobactéria e a proteína TraR que, por sua vez, regula a expressão dos genes *tra*, responsáveis pela transferência plasmidial de fragmentos de DNA entre a população de *A. tumefaciens*. Esta regulação se dá por sinalização *quorum sensing*, e os genes *tra* são ativados em presença do complexo TraR-AHL. Cada polipeptídeo TraR se associa com uma molécula do ligante AHL. Uma das razões da interação entre homólogos

LuxR e seu ligante AHL é para proporcionar multimerização das proteínas (Choi e Greenberg, 1992b). Tem sido demonstrado que quando a *A. tumefaciens* cresce em presença de AHL, a proteína TraR purificada do organismo selvagem apresenta predominantemente configuração dimérica. A remoção das moléculas de homoserina lactonas causa a dissociação do dímero (Qin *et al.*, 2000; Zhu e Winans, 2001). Similarmente, outro homólogo de LuxR, a proteína CarR da *Erwinia carotovora*, multimeriza na presença do seu ligante AHL (Welch *et al.*, 2000). Análises do heterodímero mostram que metade dos resíduos que compõem a proteína fazem parte de uma região crítica para a sua dimerização (Qin *et al.*, 2000).

A região C-terminal da proteína LuxR contém um domínio hélice-alça-hélice (*helix-turn-helix* ou HTH) que é importante para a atividade da ligação da proteína no DNA (Choi e Greenberg, 1992a). Interessantemente, uma mutante de LuxR, modificado (deletado) na região N-terminal (denominada de LuxR $\Delta$ N) demonstrou atividade de acoplamento ao DNA, de forma independente da molécula de OHHL (Choi e Greenberg, 1991). Estes resultados indicam que a região N-terminal de LuxR tem a função de manter uma conformação inativa na ausência de OHHL. Os autores deste trabalho sugerem que a interação entre a OHHL e a LuxR seja necessária para ocupar a região N-terminal, a fim de impedir a ação inibitória dessa região, pois esta, quando livre, parece mascarar a interação da região com o DNA, inativando a proteína regulatória. Estudos com CarR e TraR têm mostrado evidências de que quando estes homólogos se ligam ao seu ligante AHL correspondente ocorre uma mudança conformacional na proteína regulatória (Qin *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo* têm indicado que a ativação do operon *lux* tanto por LuxR $\Delta$ N quanto por LuxR envolve uma interação com a subunidade  $\alpha$  do domínio da RNA polimerase ( $\alpha$ CTD) e que a conservação da localização *lux* box é crítica para a ativação transcricional (Stevens e Greenberg, 1997; Stevens *et al.*, 1999; England e Greenberg, 1999). Destas evidências, é aceito que a família das proteínas regulatórias LuxR primeiramente interagem com sua molécula indutora da família das homoserina lactonas e este acoplamento provoca uma mudança conformacional que permite a dimerização da proteína. Este dímero interage com uma região do DNA e atua, portanto, como um ativador transcricional em conjunto com a RNA polimerase.



### 3.3.2 Família LuxI das Proteínas Homoserina Lactona Sintetases

Apesar do reconhecimento precoce de que os homólogos LuxI eram certamente responsáveis pela síntese de homoserina lactonas, somente em 1996 dois grupos de pesquisa mostraram separadamente evidências da atividade enzimática deste grupo de proteínas (Moré *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996). Esses homólogos constituem, agora, a chamada família LuxI, de proteínas homoserina lactonas sintetases.

A Figura 3.6 apresenta algumas das estruturas conhecidas da classe das homoserina lactonas. Com base na estrutura da molécula os pesquisadores acreditavam que a cadeia acil era derivada do metabolismo de ácidos graxos e o grupo homoserina lactona era derivado de um aminoácido. Em um primeiro trabalho foi mostrado que extrato de células de *V. fischeri*, quando suplementadas com S-adenosilmetionina (SAM) e um derivado de ácido graxo, eram capazes de sintetizar OHHL (Eberhard *et al.*, 1991) e a partir desta informação sugeriu-se que SAM era o substrato necessário para a síntese de acil homoserina lactonas. Outros trabalhos realizados posteriormente demonstraram que a SAM é o aminoácido principal para a síntese de acil homoserina lactonas por homólogos LuxI (Jiang *et al.*, 1998; Val e Cronan Jr., 1998; Parsek *et al.*, 1999).

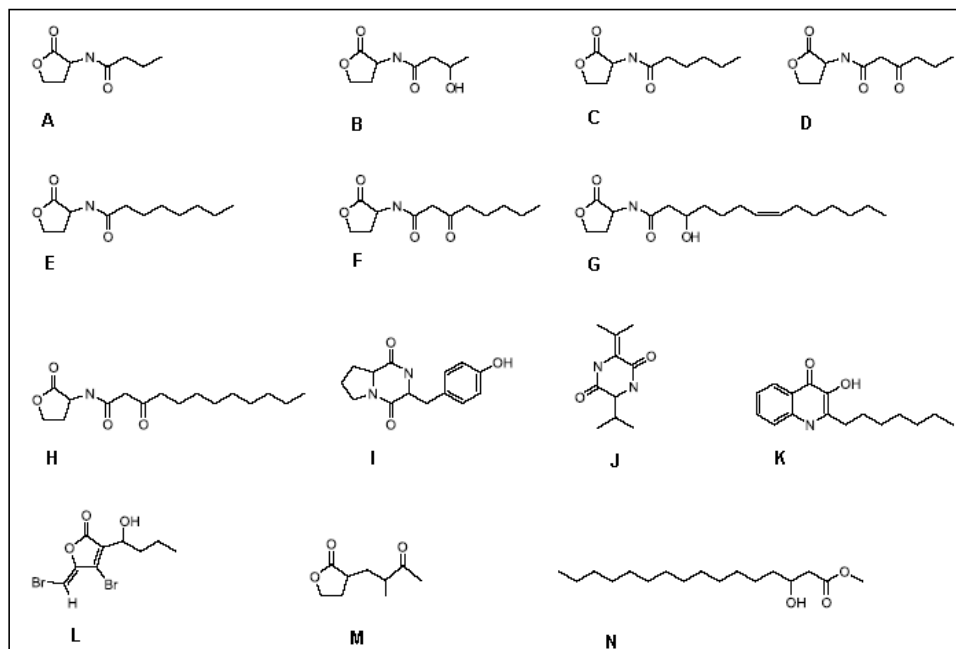


Figura 3.6 Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*: A-H: Algumas das moléculas acil homoserina lactonas mais comuns encontradas nos microrganismos (A) N-butanoyl-L-homoserina lactona (BHL); (B) N-(3-hidroxibutanoyl)-L-homoserina lactona (HBHL); (C) N-hexanoyl-L-homoserina lactona (HHL); (D) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserina lactona (OHHL); (E) N-octanoyl-L-homoserina lactona (OHL); (F) N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserina lactona (OOHL); (G) N-(3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoyl)-L-homoserina lactona (HtdDHL); (H) N-(oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (OdDHL). I, J: Duas dicetopiperazinas microbianas: (I) ciclo(L-Pro-L-Tyr); (J) ciclo( $\alpha$ Ala-L-Val). K: 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS); L: Uma furanona da *Delisea pulchra*, 4-bromo-5-(brometilen)-3-(1'-hidroxibutil)-2(5H)-furanona. M: Uma butirolactona supostamente produzida por *Xanthomonas campestris*. N: ácido 3-hidroxipalmítico metil éster (3OHPAME) (Whitehead *et al.*, 2001).

Eberhard e colaboradores (1991) sugeriram que a coenzima A 3-oxohexanoyl ou proteína carregadora do grupo acil (ACP) era o mais provável doador do lado da cadeia do ácido graxo da molécula de OHHL. Schaefer *et al.* (1996) e Parsek *et al.* (1999) propuseram que a SAM se acopla ao sítio ativo da enzima e o grupo acil é transferido por uma proteína ACP. Dentro da mesma proposta, o grupo acil então forma uma ligação amida com o grupo amino da SAM e, conseqüentemente a lactonação resulta na síntese da acil homoserina lactona e no subproduto 5'-metil-tioadenosina (Figura 3.7).

Estudos de mutação sítio-específica de LuxI e RhII (esta última encontrada na *Pseudomonas aeruginosa*) revelaram que a deleção de certos resíduos de aminoácidos conservados na metade da região N-terminal destas proteínas acarretam em uma perda ou em uma redução drástica da atividade enzimática (Hanzelka e Greenberg., 1995; Parsek *et al.*,

1999). Acredita-se que os aminoácidos conservados na metade da região C-terminal sejam necessários para a seleção de acil por ACP (Hanzelka e Greenberg, 1995).

Muitas espécies de bactérias podem produzir mais de um tipo de uma molécula acil homoserina lactona e tem sido reportado que certos homólogos podem utilizar ACPs carregadas diferentemente para produzir as moléculas indutoras com diferentes comprimentos de cadeia (Schaefer *et al.*, 1996; Parsek *et al.*, 1999).

A *C. violaceum* também possui um homólogo de LuxI, uma proteína que sintetiza a homoserina lactona (CviI). A molécula por ela produzida é a N-hexahoil-L-homoserina lactona (HHL), pertencente ao grupo C mostrado na Figura 3.7. Esta é a única molécula da classe das homoserina lactonas reportada até agora, produzida por *C. violaceum*. As características dos genes e de seus produtos responsáveis pela sinalização *quorum sensing* em *C. violaceum* serão abordadas na seção 3.4.1.

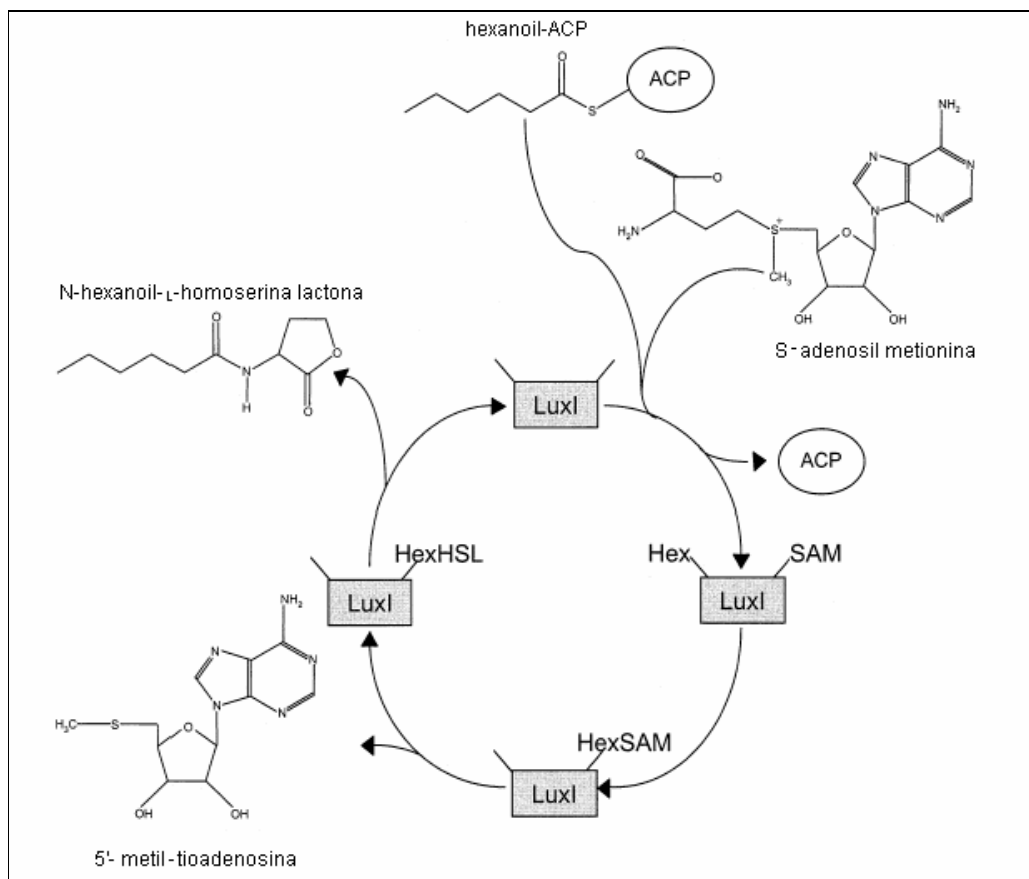


Figura 3.7 Esquema da síntese de moléculas AHL por homólogos da LuxI. Exemplo da síntese de HHL: o aminoácido S-adenosil metionina (SAM) se liga ao sítio ativo da LuxI, e o grupo hexanoil é transferido por uma proteína carregadora (ACP); o grupo hexanoil forma então uma ligação amida com o grupo amino da SAM; a molécula 5'-metil-tioadenosina é posteriormente formada, e a reação de lactonação resulta na síntese de HHL (Schafer *et al.*, 1996).

### 3.4 *Chromobacterium violaceum* - Organismo Modelo

Com o sequenciamento do genoma da *C. violaceum* por um consórcio de laboratórios brasileiros (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003), o Brasil se incluiu entre os países com interesse no DNA deste microrganismo. A partir da informação genômica disponível pode-se então avançar em estudos que explorem a funcionalidade dos genes, sua regulação e seu papel em determinada via metabólica de interesse. Estudos pós-genômicos que explorem a fisiologia de *C. violaceum* é de grande importância, uma vez que os produtos de alguns genes apresentam grande potencial biotecnológico. Para entender os interesses que levaram esta bactéria a ser escolhida para ter o seu genoma sequenciado, serão descritos a seguir um breve histórico e algumas de suas características mais importantes conhecidas até agora.

A *C. violaceum* é classificada como uma bactéria saprófita, isto é, que se alimenta de animais e plantas em decomposição, não patogênica, Gram-negativa, aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solos e águas de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes (Durán e Menck, 2001). No Brasil, é encontrada principalmente às margens do Rio Negro, na Amazônia. Este organismo tem sido objeto de estudo para muitos pesquisadores, principalmente por despertar interesse pelo seu fenótipo marcante: a produção de um pigmento violeta que caracteriza a coloração da colônia. O extrato bruto do pigmento violeta tem sido um atrativo desde 1867 quando foi observado por Boisbaudran (Boisbaudran, 1882). A primeira publicação sobre a constatação do pigmento violeta foi em 1882 em um artigo de Boisbaudran na *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences* com o seguinte título: “*Matière colorante se formante dans la colle de farine*” (Material violeta se forma sobre a cola de farinha) (Boisbaudran, 1882). O autor observou uma coloração violeta formada sobre a base da farinha e atribuiu tal coloração a um pequeno organismo. Esta observação havia sido feita 15 anos antes da publicação de Boisbaudran, portanto em 1867. De forma independente, em 1880 um cientista italiano, Curzio Bergonzini, observou acidentalmente a formação de pigmento violeta em soluções de albumina de ovo, esquecidas de serem descartadas (Retori, 1996). Tais soluções haviam sido preparadas para estudos de mecanismo de ação que retardam a putrefação, e depois de um tempo apresentaram uma película violeta. Bergonzini suspeitou inicialmente de *Cromococcus violaceum*, que era a única bactéria de pigmentação violeta conhecida na época. Porém, quando ele tentou solubilizar a película violeta em água percebeu que não se tratava de tal

microrganismo. A partir deste fato, Bergonzini conclui que se tratava de uma nova bactéria, e a nomeou de *Cromobacterium violaceum*, publicado em seu trabalho em 1881 (Retori, 1996). Acredita-se que o organismo referido por Boisbaudran era *Chromobacterium violaceum*, a partir do espectro de absorção da luz visível observado pelo próprio Boisbaudran. Em 1881 Zimerman corrigiu a grafia da palavra *Cromobacterim* dada por Bergonzini, alterando para *Chromobacterium* (Retori, 1996).

Apesar de estudos de longa data, somente em 1958 a estrutura química da violaceína, composto majoritário do extrato de pigmento violeta de *C. violaceum*, foi corretamente deduzida por Ballantine e colaboradores (Ballantine, 1958). DeMoss e Evans (1959) ao isolarem violaceína produzida por *C. violaceum* observaram a presença de um pigmento análogo, de baixa concentração, denominado desoxiviolaceína. Enquanto a violaceína apresentava coloração violeta, esse outro pigmento apresentava coloração púrpura. Embora os estudos referentes à sua biossíntese tenham se iniciado há quase 70 anos, pouco se sabe sobre a regulação da via biossintética de violaceína e seu papel fisiológico para a bactéria. Acredita-se que, por causa da baixa solubilidade em água e ao alto coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 1,7 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 577 \text{ nm}$ ), violaceína esteja envolvida na proteção contra a radiação visível, uma vez que *C. violaceum* é encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais (Antônio e Creczynski-Paza, 2004). A violaceína tem apresentado potencial farmacológico, de grande importância, pois há evidências de sua ação antibiótica, antitumoral, antivirótica e anti-*Trypanosoma cruzi* (Antônio *et al.*, 1991; Antônio, 1994; Miller *et al.*, 1988; Durán e Menck, 2001).

A *C. violaceum* destaca-se também por ser um dos poucos microrganismos até agora estudados, capaz da biossíntese do homopolímero de 3-hidroxivalerato (poli-hidroxivalerato ou PHV), quando cultivado na presença de valerato como única fonte de carbono, e concentrações limitantes de nitrogênio, bem como outros tipos de polihidroxialcanoatos (PHA's), biopolímeros de grande interesse biotecnológico (Steinbüchel *et al.*, 1993) por apresentarem características semelhantes e/ou superiores aos derivados petroquímicos.

Ocasionalmente esta bactéria pode atuar como um patógeno oportunista em animais e seres humanos e provocar septicemia (infecção generalizada) fatal de lesões na pele com abscessos no fígado e pulmão. Após uma análise de indivíduos infectados e diagnosticados nos Estados Unidos, concluiu-se que a *C. violaceum* é um agente patogênico de baixo grau, mas capaz de causar severas infecções, principalmente em pacientes imunodeprimidos (Durán e Menck, 2001). Entretanto, essas generalizações são questionáveis, visto que já foi registrado

um caso grave de infecção em uma criança de 12 anos, que não apresentava imunodepressão (Bilton e Johnson, 2000). Os casos de infecção até agora registrados foram ocasionados por bactérias pigmentadas e também não pigmentadas (ausência de violaceína) (Miller *et al.*, 1988). Portanto, a patogenicidade associada a este microrganismo parece ser independente da violaceína produzida pela espécie.

A *C. violaceum* é um organismo de vida livre e, como esperado, as vias metabólicas central e intermediária desta bactéria incluem a síntese e o catabolismo de todos os 20 aminoácidos, bem como bases nucleotídicas de purina e pirimidina. Além disso, possui vias metabólicas para a síntese de uma ampla faixa de cofatores e vitaminas. É capaz de realizar a biossíntese de polissacarídeos complexos incluindo a celulose (mas não o glicogênio) bem como a síntese e degradação de uma variedade de lipídeos que são utilizados para formação da membrana e armazenamento energético (incluindo triglicerol, fosfolipídeos e lipossacarídeos) (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003). A habilidade que *C. violaceum* tem de se adaptar em diversas condições ambientais é facilitada por seu metabolismo versátil que é capaz de utilizar uma ampla faixa de fontes de energia através do uso de oxidases e redutases apropriadas, o que permite também a sua capacidade de respiração aeróbica ou anaeróbica (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003; Creczynski-Paza e Antônio, 2004). Em condições aeróbicas *C. violaceum* é capaz de crescer em meio mínimo com açúcares simples, tais como, glicose, frutose, galactose e ribose; tanto a via de Embden-Meyerhoff quanto os ciclos do ácido tricarboxílico e glicoxilato são utilizados. O suprimento de energia é provido da cadeia respiratória e também de outras vias metabólicas (Creczynski-Paza e Antônio, 2004). Em condições anaeróbicas, *C. violaceum* metaboliza glicose, produzindo ácido acético e ácido fórmico, mas não produz ácido láctico ou etanol. Esta bactéria também é capaz de utilizar aminoácidos e lipídeos como fonte de suprimento energético (Creczynski-Paza e Antônio, 2004).

### 3.4.1 Biossíntese de Violaceína e sua Regulação

Em 1934 se iniciaram os estudos da biossíntese de violaceína, quando foi observado que, ao oxigenar culturas de *C. violaceum*, o tempo de produção de violaceína era significativamente reduzido. Este fato foi confirmado no final da década de 50 quando se

descobriu que, para sintetizar a violaceína, a bactéria necessitava de oxigênio molecular e de L-triptofano.

A origem da estrutura molecular da violaceína a partir de L-triptofano foi desvendada recentemente por Momen e Hoshino (2000), que utilizaram o L-triptofano marcado com  $^{14}\text{C}$  em diferentes posições. Estes pesquisadores mostraram evidências de que o L-triptofano é incorporado na molécula de violaceína, com exceção do carbono carboxílico (C1), eliminado provavelmente por um processo de descarboxilação durante a biossíntese. Vários compostos intermediários na biossíntese de violaceína, como o ácido cromopirrólico, proviolaceína, e prodesoxiviolaceína foram propostos, além de rearranjos intramoleculares do anel indólico do lado do 5-hidroindol para a formação da molécula de violaceína (Momen e Hoshino, 2000), e das enzimas envolvidas nas etapas da via biossintética (operon *vioABCD*) (August *et al.*, 2000). Estes últimos trabalhos propõem um esquema para a biossíntese da violaceína, porém algumas etapas intermediárias da via ainda permanecem não esclarecidas (Figura 3.8).

As condições ambientais interferem na produção de violaceína. A *C. violaceum* produz o pigmento violeta somente sob aerobiose, e a temperatura do meio deve estar em torno de 30°C (Antônio, 1994). Evidências experimentais também mostram que a produção de violaceína é inibida em presença de glicose, e induzida em presença de fontes de carbono de cadeia maior, tais como sacarose e amido de arroz (Antônio, 1994) e também em presença de glicerol (Oliveira *et al.*, 2003). Este comportamento é esperado porque a glicose, e outras fontes de carbono facilmente utilizáveis têm sido consideradas supressoras da biossíntese de vários metabólitos secundários, tais como neomicina, bacitracina, cefalosporinas, alcalóides de Ergot, penicilina e violaceína (Drew e Demain, 1977). Dados do seqüenciamento mostram que a biossíntese de violaceína é dependente do metabolismo de carboidratos não somente pela via da hexose monofosfato (HMP), mas também através da via glicolítica e via de Entner-Doudoroff, a partir do qual NADPH deve ser produzido, uma vez que não há atividade de 6-fosfogluconato nesta bactéria (Antônio e Creczynski-Pasa, 2004).

Através do seqüenciamento de DNA, quatro genes foram identificados como responsáveis pela biossíntese da violaceína em *C. violaceum* (Pemberton *et al.*, 1991; August *et al.*, 2000), posteriormente associados ao operon *vioABCD* (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003). Os genes *vioA*, *vioB*, *vioC*, e *vioD* possuem 1254 pb, 2994 pb, 1287 pb e 1119 pb, respectivamente. De acordo com os dados da anotação do genoma da *C. violaceum* ([www.brgene.lncc.br/cviolaceum/](http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/)) dos produtos dos genes que compreendem o



operon, VioA, VioC e VioD são monoxigenases, e VioB é uma poliketídeo sintase, sendo este último uma enzima comum, encontrada em microrganismos que sintetizam antibióticos.

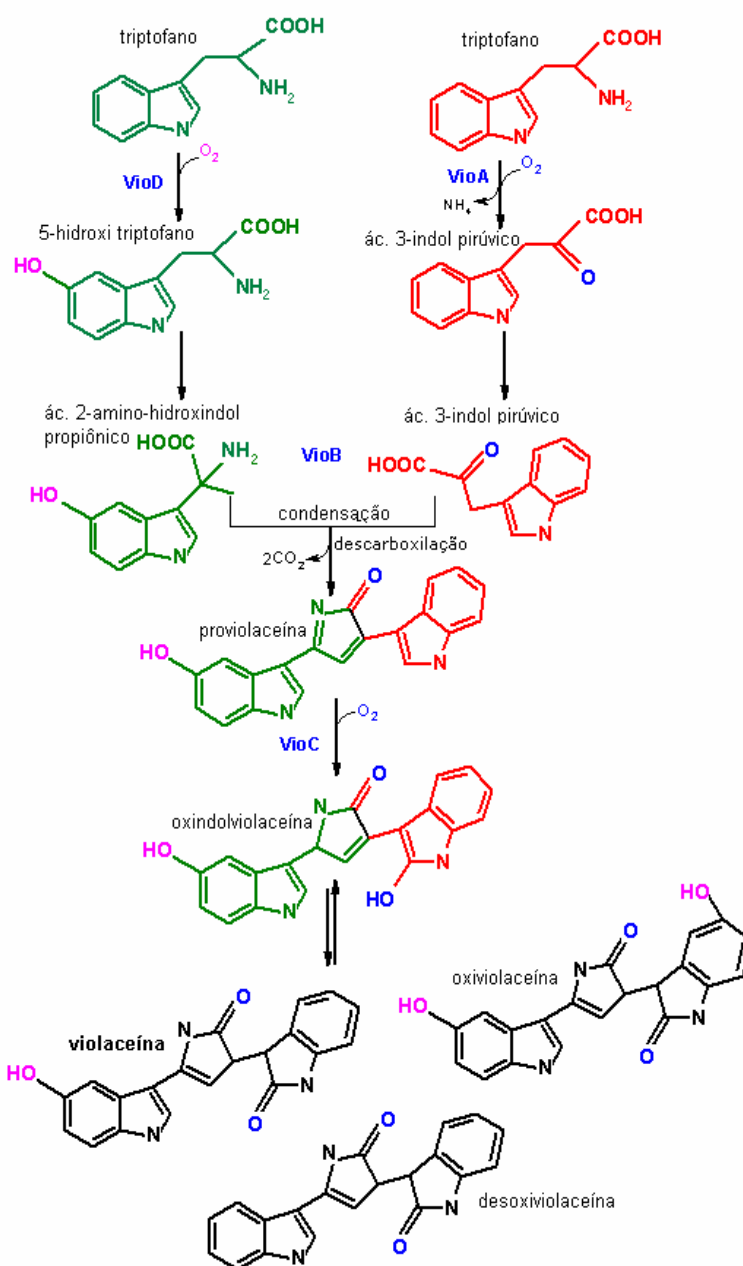


Figura 3.8 Via de biossíntese de violaceína (August *et al.* 2000). Observe a localização dos produtos dos genes *vioD*, *vioA*, *vioB*, e *vioC* que constituem o operon *vioABCD*, na via de biossíntese da violaceína.

Taylor (1997), McClean e colaboradores (1997) mostraram evidências de que a produção de violaceína em *C. violaceum* (linhagem ATCC 31532) é induzida pela presença de moléculas de N-acil homoserina lactonas acetiladas, especificamente pela N-hexanoil-L-homoserina lactona. Esta molécula pertence à classe das homoserina lactonas. Estas evidências experimentais mostram que o *quorum sensing* regula a biossíntese de violaceína, e é o único tipo de regulação gênica até agora conhecido, que interfere na produção do pigmento violeta característico em *C. violaceum*.

Durante a anotação do genoma da *C. violaceum*, verificou-se que as proteínas que sintetizam as moléculas AHL são bem conservadas e pertencem às família LuxR-LuxI. Dois genes adjacentes, *cviI* e *cviR*, homólogos a *luxI* e *luxR*, respectivamente, são transcritos em fitas opostas do DNA.

Outras características fenotípicas em *C. violaceum* sob regulação *quorum sensing* têm sido reportadas. Além da biossíntese de violaceína, também a produção de cianeto (via operon *acnABC*), e degradação através do produto dos genes *cynT* (cianato permease) *cynS* (cianase) (Duran e Menk, 2001), bem como a produção de elastase (Taylor, 1997) são afetadas pelo *quorum sensing*. ORFs (*open reading frames* ou quadros abertos de leitura) codificando quitinases extracelulares também foram reportadas estarem sob regulação *quorum sensing* (Chernin *et al.*, 1998). Estas ORFs são provavelmente responsáveis pela habilidade que a *C. violaceum* possui para sobreviver utilizando quitina como fonte de carbono e nitrogênio (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003). Outras ORFs presentes em *C. violaceum* controladas por *quorum sensing* são aquelas que codificam para a elastase (*lasA* e *lasB*) e para o antibiótico fenazina (ORFs CV0931 e CV2663). Além destes, alguns genes que codificam para enzimas extracelulares (como por exemplo, serina protease, collagenase, e oligopeptidase) possuem sequências regulatórias homólogas às encontradas em genes regulados por *quorum sensing*, o que demonstra a possibilidade de estarem sob a mesma regulação (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003).

### 3.5 O Uso de Mini-Tn5 *luxCDABE* na Identificação e Monitoramento de Genes-Alvo

Há muito tempo os transposons têm sido utilizados para gerar mutantes por inserção transposicional para estudos genéticos e fisiológicos. Entretanto, não é garantido que o transposon não será re-inserido novamente a partir de seu sítio original de inserção, o que pode comprometer os estudos. Este fato é particularmente um problema se o transposon for inserido em genes cromossômicos porque estes genes são relativamente difíceis de serem rastreados. Para resolver este problema de incerteza, De Lorenzo e colaboradores (De Lorenzo *et al*, 1990; De Lorenzo e Timmis, 1994) produziram derivados de transposon Tn5, no qual o gene transposase não fica no transposon e é carregado por um plasmídeo suicida. Este replicon é impedido de ser replicado na bactéria que será mutada por inserção transposicional. O plasmídeo suicida é introduzido na linhagem a ser estudada através de uma conjugação (*mating*). Em algumas transconjugantes, a transposição do elemento mini-Tn5 irá ocorrer antes que o plasmídeo seja perdido. A resistência à canamicina é codificada por Tn5 e os eventos de transposição na linhagem a ser mutada podem ser facilmente detectados através do plaqueamento do produto da conjugação e do doador contendo o plasmídeo suicida em um meio com canamicina. Se a linhagem a ser estudada é resistente a canamicina, outros marcadores podem ser explorados através do uso de uma variedade de mini-Tn5 construídas por De Lorenzo e colaboradores (De Lorenzo *et al*, 1990; De Lorenzo e Timmis, 1994). A inserção de mini-Tn5 na bactéria a ser estudada é estável, uma vez que o gene da transposase é perdido quando o plasmídeo não se replica. Portanto esta técnica de transposição utilizando mini-Tn5 gera mutantes estáveis que podem ser utilizadas para estudos fisiológicos dentre outros.

Sensores bioluminescentes oferecem a facilidade de quantificar a expressão de um gene com alta sensibilidade, de forma não destrutiva e também de forma dinâmica, ou seja, em tempo real (Winson *et al*, 1998). Considerando que muitos sistemas oferecem a desvantagem por causa da atividade de várias enzimas hospedeiras, com a bioluminescência este problema é muito menor, uma vez que a bioluminescência é extremamente rara fora do habitat marinho.

A bioquímica e genética de bactérias bioluminescentes e a ampla aplicação para a investigação da fisiologia microbiana (incluindo o monitoramento da viabilidade celular e

expressão do gene), têm sido intensivamente estudadas (Meighen, 1991; Stewart, 1997; Stewart *et al.*, 1997). Os genes *lux* para a luminescência são arranjados em um único operon, *luxCDABE*. O *luxCDE* codifica o complexo ácido graxo redutase, envolvido na síntese de aldeído, que é substrato para a reação catalisada pela subunidade luciferase LuxAB (Meighen, 1991). Dois dos substratos para a reação de bioluminescência, mononucleotídeo flavina redutase (FMNH<sub>2</sub>) e oxigênio molecular, são prontamente disponíveis em bactérias aeróbicas. Biossensores que empregam a luciferase codificada pelos genes *luxAB*, são freqüentemente utilizados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Meighen, 1991; Hill, 1997; Prosser *et al.*, 1997); entretanto, a necessidade de fornecer aldeído exógeno é uma desvantagem para a análise ou medidas em plantas ou em experimentos *in vivo*. A utilização do operon *luxCDABE* em bactérias Gram-negativas supera esta necessidade de incorporar aldeído ao sistema (Hill, 1997).

Apesar dos genes *lux* serem isolados de bactérias Gram-negativas (Meighen, 1991), suas propriedades funcionais podem variar entre as espécies. A origem particular dos genes *lux* para serem utilizados como biossensores (*reporters*) é uma consideração importante. A faixa limite de temperatura da maioria dos genes *lux*, derivados do *Vibrio fischeri* (menor que 30°C) e *Vibrio harveyi* (menor que 37°C) pode ser restrita para algumas aplicações, como por exemplo, em estudos da expressão de genes em animais patogênicos. Por outro lado, as enzimas que codificam o operon *luxCDABE* da bactéria *Photobacterium luminescens* são funcionais a temperatura de 45°C. Com base nesta vantagem, Winson e colaboradores (1998) construíram vários plasmídeos e vetores mini-Tn5 contendo um cassete *luxCDABE* derivado do operon *lux* do *P. luminescens* para ser usado em bactérias Gram-negativas.

A prova de promotores através da inserção aleatória de transposons (sem a região promotora) no cromossomo origina freqüentemente fusões transcricionais e mutações. Além das aplicações associadas com a construção original de Lorenzo e colaboradores (1990), a expansão da gama de mini-Tn5 disponíveis para incluir cassetes *luxCDABE* proposto por Winson e colaboradores (1998) fornecem a oportunidade de se estudar genes durante a fase de crescimento ou em resposta a alguma variação ambiental durante o cultivo do microrganismo. Todavia, o uso de luciferases para reportar a expressão de genes durante a fase de crescimento pode ser bastante laborioso se forem utilizados métodos clássicos. O uso de equipamentos automáticos como fotômetros/luminômetros permitem, no entanto, ensaios experimentais com alta sensibilidade e rápida resposta para uma grande quantidade de dados de entrada. Neste trabalho, a inserção aleatória de mini-Tn5 *luxCDABE* foi a

estratégia adotada para produzir mutantes de *C. violaceum* com o objetivo de identificar regiões de regulação no genoma que detêm o controle da produção de violaceína.

### 3.6 Estudos Pós-Genômicos e o Uso de Ferramentas de Bioinformática

Com a descoberta do código e do fluxo da informação biológica dos ácidos nucleicos para as proteínas (dogma central), tais polímeros passaram a constituir os principais objetos de estudo de uma nova ciência, a biologia molecular. Logo surgiram métodos de seqüenciamento desses polímeros, principalmente do DNA, que permitiam a investigação de suas seqüências monoméricas constituintes. Desde então, mais de 40 bilhões dessas seqüências já foram produzidas e estão disponíveis nos bancos de dados públicos.

Na segunda metade da década de 90, com o surgimento dos seqüenciadores automáticos de DNA, para ordenamento das bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T), houve uma explosão na quantidade de seqüências a serem armazenadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/genbankstats.html>) exigindo recursos computacionais cada vez mais eficientes. Além do armazenamento ocorria, paralelamente, a necessidade de análise desses dados, o que tornava indispensável a utilização de plataformas computacionais eficientes para a interpretação dos resultados obtidos. Foi daí então que nasceu a bioinformática, uma nova ciência que une diversas áreas de conhecimento: a engenharia de softwares, a matemática, a estatística, a ciência da computação e a biologia molecular (Davila, 2002; Prosdocimi *et al.*, 2003), entre outras.

A engenharia química pode beneficiar-se amplamente destes dados, visto que a fundamentação oferecida pela abordagem de processos lhe permite tratar esses dados de forma integrada, modelá-los, e submetê-los aos testes de bancada, para posterior aplicação biotecnológica.

### 3.6.1 Bancos de Dados Públicos

O investimento contínuo na construção de bancos de dados públicos é um dos motivos do sucesso dos projetos genoma e, em especial, do Projeto Genoma Humano. Devido à magnitude do conjunto de dados produzidos torna-se fundamental a organização desses dados em bancos que permitam acesso on-line.

Os bancos de dados envolvendo seqüências de nucleotídeos, de aminoácidos ou estruturas de proteínas (Tabela 3.1) podem ser classificados em bancos de seqüências primários e secundários. Os primeiros são formados pela deposição direta de seqüências de nucleotídeos, aminoácidos ou estruturas protéicas, sem qualquer processamento ou análise. Os principais bancos de dados primários são o GenBank, o EBI (European Bioinformatics Institute), o DDBJ (DNA Data Bank of Japan) e o PDB (Protein Data Bank). Os três primeiros bancos são membros do INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) e cada um desses centros possibilitam a submissão individual de seqüências de DNA. Os bancos de dados secundários, como o PIR (Protein Information Resource) ou o SWISS-PROT, são aqueles que derivam dos primários, ou seja, foram formados usando as informações depositadas nos bancos primários. Por exemplo, o SWISS-PROT é um banco de dados onde as informações sobre seqüências de proteínas foram anotadas e associadas a informações sobre função, domínios funcionais, proteínas homólogas e outros (Bairoch e Boeckmann, 1991).

Os bancos de seqüências também podem ser classificados como bancos estruturais ou funcionais. Os bancos estruturais mantêm dados relativos à estrutura de proteínas. Embora a seqüência de nucleotídeos, a seqüência de aminoácidos e a estrutura de proteína sejam formas diferentes de representar o produto de um dado gene, esses aspectos apresentam informações diferentes e são tratados por projetos diferentes, que resultam em bancos específicos. Dos bancos funcionais, o KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) é um dos mais utilizados. Disponibiliza *links* para mapas metabólicos de organismos com genoma completamente ou parcialmente seqüenciados a partir de seqüências e de busca.

Tabela 3.1 Banco de dados públicos mais utilizados em bioinformática.

Banco de dados		Endereço (URL)
GenBank	Banco de dados americano de seqüências de DNA e proteínas	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
EBI	Banco de dados europeu de seqüências de DNA	<a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>
DDBJ	Banco de dados japonês de seqüências de DNA	<a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp/">http://www.ddbj.nig.ac.jp/</a>
PDB	Armazena estruturas tridimensionais resolvidas de proteínas	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>
GDB	Banco de dados oficial do projeto genoma humano	<a href="http://www.gdb.org">http://www.gdb.org</a>
TIGR	Banco com informações de genomas de vários organismos diferentes	<a href="http://www.tigr.org/tdb/">http://www.tigr.org/tdb/</a>
PIR	Banco de proteínas anotadas	<a href="http://www-nbrf.georgetown.edu/">http://www-nbrf.georgetown.edu/</a>
SWISS-PROT	Armazena seqüências de proteínas e suas respectivas características moleculares	<a href="http://www.expasy.ch/spro/">http://www.expasy.ch/spro/</a>
INTERPRO	Banco de dados de famílias, domínios e assinaturas de proteínas	<a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro/">http://www.ebi.ac.uk/interpro/</a>
KEGG	Banco com dados de seqüências de genomas de vários organismos diferentes e informações relacionadas às suas vias metabólicas	<a href="http://www.genome.ad.jp/kegg/">http://www.genome.ad.jp/kegg/</a>

### 3.6.2 Ferramentas de Alinhamento de Seqüências

O alinhamento de seqüências possui uma diversidade de aplicações na bioinformática, sendo considerada uma das operações mais importantes desta área. Este método de comparação procura determinar o grau de similaridade entre duas ou mais seqüências, ou a similaridade entre fragmentos dessas seqüências. No caso de mais de duas seqüências o processo é denominado alinhamento múltiplo. É importante salientar que similaridade e homologia são conceitos distintos. O alinhamento indica o grau de similaridade entre seqüências; já a homologia é uma hipótese de cunho evolutivo, e não possui gradação: duas seqüências são homólogas caso derivem de um ancestral comum ou, caso esta hipótese não se comprove, simplesmente não são homólogas. Existem vários programas que realizam esta tarefa, e a grande maioria deles pode ser utilizada on-line (Veja Tabela 3.2) como, por exemplo, os programas ClustalW (Higgins *et al.*, 1994), Multialin, e BLAST 2 sequences (Altschul *et al.*, 1990). O processo consiste em introduzir espaços (*gaps*) entre os monômeros

de uma ou mais seqüências a fim de obter o melhor alinhamento possível. A qualidade de um alinhamento é determinada pela soma dos pontos obtidos por cada unidade pareada (*match*) menos as penalidades atribuídas pela introdução de *gaps* e posições não pareadas (*mismatch*) (Prosdocimi *et al.*, 2003).

Quanto à região analisada, o alinhamento de seqüências pode ser classificado em dois tipos, o alinhamento global e o alinhamento local. No alinhamento global, as seqüências envolvidas devem ser alinhadas de um extremo ao outro, dando origem a apenas um resultado. Já no alinhamento local, procura-se alinhar apenas as regiões mais conservadas, independentemente da localização relativa de cada região em sua seqüência. Conseqüentemente, este alinhamento tem como resultado uma ou mais regiões conservadas entre as seqüências (Prosdocimi *et al.*, 2003).

O alinhamento global é freqüentemente utilizado para determinar regiões mais conservadas de seqüências homólogas. Exemplos de programas que utilizam este alinhamento são ClustalW e Multialin. O alinhamento local é geralmente utilizado na procura por seqüências homólogas ou análogas (funcionalmente semelhantes) em banco de dados. O algoritmo utilizado pelo popular programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) realiza este tipo de alinhamento.

Tabela 3.2 Programas de alinhamento mais utilizados.

Programa	Endereço (URL)
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html</a>
Multialin	<a href="http://prodes.toulouse.inrs.fr/multialin/multialin.html">http://prodes.toulouse.inrs.fr/multialin/multialin.html</a>
BLAST, BLAST 2 sequence	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>

### 3.6.3 As Redes de Petri em Redes Regulatórias

Sistemas de equações diferenciais ordinárias têm sido amplamente empregados para modelagem e análise de processos celulares como metabolismo, redes regulatórias, expressão gênica, e transporte de membrana. Entretanto, uma metodologia mais recentemente introduzida, as redes de Petri, está sendo utilizada para o mesmo fim, por permitir representar esses processos de maneira mais intuitiva. Nosso grupo tem realizado esforços no sentido de utilizar as redes de Petri para modelar vias metabólicas e também redes regulatórias.



É interessante destacar que uma via regulatória é uma representação de um conjunto de interações moleculares, a maioria delas referindo-se a interações DNA-proteína e proteína-proteína, como é o caso da atuação dos chamados fatores de transcrição com repressores e indutores, dos quais a CviR é um exemplo. Pode-se também ter a interação desses fatores de transcrição com produtos do metabolismo celular, que ativam ou reprimem a expressão de um certo gene ou de um conjunto de genes, simultaneamente. A interação das vias (ou redes) metabólicas com as redes regulatórias pode se dar através de um agente comum, como é o caso de produtos do metabolismo, a exemplo de moléculas de triptofano. Via de regra, um produto do metabolismo pode modificar a atividade de uma enzima de sua própria via de biossíntese, ou agir sobre um fator de transcrição (uma outra proteína) para ativar ou desativar a expressão de um gene, como discutido no item 3.4.

O modelo de rede de Petri foi proposto originalmente por Carl Adam Petri em 1962, para modelar a comunicação entre autômatos (Cardoso e Valette, 1997). As redes de Petri são grafos bipartidos e orientados que oferecem uma maneira formal para se representar as estruturas de um sistema a eventos discretos, simular seu comportamento e extrair algumas conclusões sobre as propriedades do sistema (Reddy, 1994).

A modelagem de vias biológicas através de redes de Petri ordinárias foi proposta inicialmente por Reddy (1994) por permitir abstrair das propriedades das redes de Petri conclusões qualitativas sobre o comportamento e estrutura dessas vias, como informações sobre as atividades enzimáticas, potencialidade de acúmulo de metabólitos em certas condições, e possibilidade de existência de algum metabólito que possa inibir o progresso da reação.

Sistemas de equações diferenciais são largamente empregados para modelagem de vias bioquímicas, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa do modelo, porém é difícil de se observar seu mecanismo de funcionamento intuitivamente, no sentido biológico. Para poder englobar esses modelos com equações diferenciais que possuem características contínuas de forma mais intuitiva, e que as redes de Petri ordinárias não conseguem capturar por abstrair apenas características discretas, modelos com redes de Petri híbridas foram recentemente propostos por Matsuno (Matsuno *et al.*, 2000; Matsuno *et al.*, 2003). A rede de Petri híbrida é uma extensão da rede de Petri que permite modelar sistemas que exibem características discretas e contínuas, como é o caso das vias metabólicas e regulatórias acopladas em um único sistema.

O software *Cell Illustrator* (versão 1.10) foi utilizado para a modelagem por redes de Petri híbrida e é um ambiente para simulação e representação de sistemas bioquímicos empregando a arquitetura de rede de Petri híbrida e funcional (Matsuno *et al.*, 2001a-b). Pode ser obtido gratuitamente no endereço <http://www.genomicobject.net>. Este programa pode ser executado nas plataformas Linux, Microsoft Windows, Mac OS X e Unix, necessitando apenas da máquina virtual Java 1.4 ou superior (Nagasaki *et al.*, 2002). A versão pública possui como restrição a implementação de 5.000 elementos (lugares, transições e arcos) da rede de Petri.

Como a rede de Petri híbrida é uma extensão da rede de Petri ordinária, a idéia geral será discutida brevemente. Rede de Petri ordinária é um tipo de grafo onde há dois tipos especiais de vértices: o lugar (representado por um círculo) e a transição (representada por um retângulo sólido) que são conectados por um arco dirigido ao qual é atribuído um valor. Lugares podem conter fichas ou *tokens* (representadas por um número inteiro não negativo ou por pontos) (Figura 3.9).

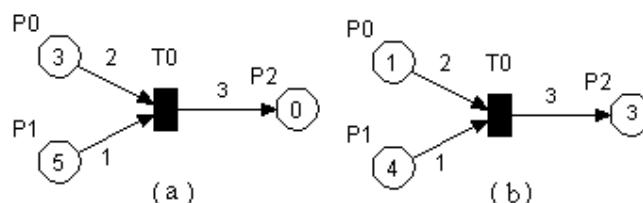


Figura 3.9 Exemplo de uma rede de Petri ordinária, antes (a) e depois (b) do disparo da transição T0.

Na Figura 3.9, os lugares P0 e P1 são os lugares de entrada, e o lugar P2 é o lugar de saída da transição T0. O valor do arco é chamado de peso. A transição só é disparada quando o número de fichas de todos os lugares de entrada for maior ou igual ao peso do arco que os conectam à transição. Quando o disparo ocorre (Figura 3.9b), é retirado dos lugares de entrada o número de fichas indicado pelo peso do arco, e depositado nos lugares de saída o número de fichas correspondentes aos pesos dos arcos que conectam a transição a cada lugar de saída.

Na rede de Petri híbrida, o lugar contínuo (representado por um círculo duplo) contém um número real não negativo de fichas, e a transição contínua (representada por um retângulo vazio) representa uma função que designa a velocidade máxima de disparo, simulando um fluxo contínuo de fichas. A velocidade de disparo de uma transição é a velocidade máxima definida para ela, enquanto o número de fichas dos lugares de entrada for suficiente; caso contrário, a velocidade de disparo é limitada pela somatória da quantidade de fichas presente nos lugares de entrada e dos fluxos de fichas que estão entrando nestes lugares (Villani *et al.*, 2001).

A rede de Petri híbrida comporta ainda a introdução de arcos inibidores e arcos de testes (Figura 3.10). No arco inibidor seu peso habilita a transição ao disparo apenas se o número de fichas no seu lugar de origem for menor ou igual ao seu peso. O arco de teste, por sua vez, não consome as fichas do seu lugar de origem para habilitar o disparo, e age como uma fonte contínua, inesgotável.

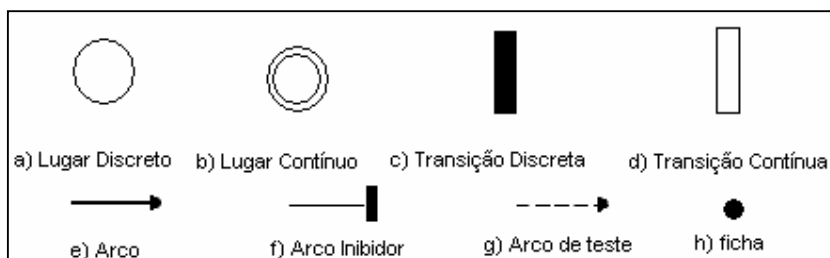


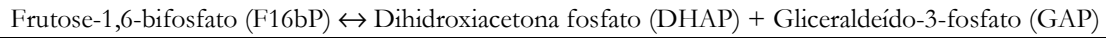
Figura 3.10. Elementos da rede de Petri híbrida.

Para a modelagem das vias metabólicas com as redes de Petri precisa-se atribuir aos lugares, fichas, transições e arcos um significado. Na modelagem proposta por Matsuno e colaboradores (2001a), cada metabólito é representado por um lugar, e as fichas representam a sua concentração. As transições definem as reações bioquímicas entre os metabólitos, e os arcos a direção do fluxo de metabólitos.

Dada uma modelagem de uma via metabólica com equações diferenciais, o procedimento necessário para se obter o modelo com redes de Petri híbridas é descrito a seguir:

1. Para cada metabólito presente na via atribuir um lugar contínuo.
2. Atribuir a concentração inicial dos metabólitos.
3. Para os metabólitos que mantêm sua concentração constante, utilizar arcos de teste que os conectam às transições.
4. Para cada equação que descreve uma reação irreversível, atribuir uma transição, e designar a equação para a função de velocidade da transição.
5. Para cada equação que descreve uma reação reversível, atribuir duas transições, uma para o sentido favorável à produção do produto a partir do substrato e a outra favorável à produção do substrato a partir do produto, associando a cada transição a parcela da equação que descreve o sentido da reação.
6. Atribuir zero aos pesos dos arcos.

Para exemplificar esse processo será utilizada a reação reversível de clivagem da frutose-1,6-bifosfato, catalisada pela enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase:



A equação cinética que define a atividade catalítica da enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase, descrita por Teusink e colaboradores (2000) é:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot \left( \frac{F16bP}{K_{F16bP}} - \left( \frac{DHAP \cdot GAP}{K_{F16bP} \cdot K_{eq}} \right) \right)}{\left( 1 + \frac{F16bP}{K_{F16bP}} + \frac{DHAP}{K_{DHAP}} + \frac{GAP}{K_{GAP}} + \frac{F16bP \cdot GAP}{K_{F16bP} \cdot K_{GAP}^i} + \frac{DHAP \cdot GAP}{K_{DHAP} \cdot K_{GAP}} \right)} \quad \text{Eq. (1)}$$

Na Equação (1),  $V$  é a velocidade da reação enzimática,  $V_{\max}$  é a velocidade máxima,  $K_i$ 's representam as constantes de interação molecular, F16bP, DHAP e GAP representam as concentrações de frutose-1,6-bifosfato, dihidroxiacetona fosfato, e gliceraldeído-3-fosfato, respectivamente;  $K_{GAP}^i$  representa a constante de inibição por GAP.

Da Figura 3.11 pode-se observar que cada transição é responsável por um sentido do fluxo dos metabólitos. A transição T0 direciona a reação no sentido substrato-produto, enquanto a transição T1 no sentido produto-substrato.

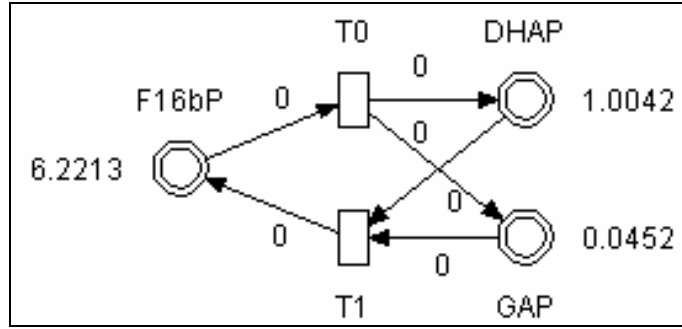


Figura 3.11 Estrutura da rede de Petri híbrida para a reação catalisada pela enzima frutose-1,6-bisfosfato aldolase.

As Equações (2) e (3) descrevem as velocidades das transições T0 e T1, respectivamente, obtidas a partir da Equação (1):

$$V_{T0} = \frac{V_{\max} \cdot \left( \frac{F16bP}{K_{F16bP}} \right)}{\left( 1 + \frac{F16bP}{K_{F16bP}} + \frac{DHAP}{K_{DHAP}} + \frac{GAP}{K_{GAP}} + \frac{F16bP \cdot GAP}{K_{F16bP} \cdot K_{GAP}^i} + \frac{DHAP \cdot GAP}{K_{DHAP} \cdot K_{GAP}} \right)} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$V_{T1} = \frac{V_{\max} \cdot \left( \frac{DHAP \cdot GAP}{K_{F16bP} \cdot K_{eq}} \right)}{\left( 1 + \frac{F16bP}{K_{F16bP}} + \frac{DHAP}{K_{DHAP}} + \frac{GAP}{K_{GAP}} + \frac{F16bP \cdot GAP}{K_{F16bP} \cdot K_{GAP}^i} + \frac{DHAP \cdot GAP}{K_{DHAP} \cdot K_{GAP}} \right)} \quad \text{Eq. (3)}$$

Neste trabalho, foi utilizada a metodologia das redes de Petri híbridas para construir e simular (ainda que de forma semi-quantitativa) o comportamento da atividade do operon *vioABCD* sob regulação *quorum sensing* em *C. violaceum*. Deseja-se, primeiramente, avaliar qualitativamente o comportamento da rede, uma vez que estes resultados preliminares podem

auxiliar no entendimento da regulação do operon, bem como no direcionamento de estratégias experimentais que possam contribuir para a compreensão da arquitetura e funcionamento da rede regulatória.

## Capítulo 4 - Material e Métodos

Para estudar a regulação da produção de violaceína a partir do genoma de *C. violaceum*, em linhas gerais, foram utilizadas algumas ferramentas de bioinformática e técnicas experimentais de bioquímica e biologia molecular. Parte do trabalho, que diz respeito às técnicas de biologia molecular e o estudo da regulação *quorum sensing*, foi desenvolvido no Instituto de Imunologia, Infecção e Inflamação, na Universidade de Nottingham-Inglaterra.

### 4.1 Ferramentas de Bioinformática

As ferramentas de bioinformática utilizadas neste estudo encontram-se disponíveis publicamente na Web, e foram escolhidas de acordo com o objetivo de cada etapa do trabalho. Inicialmente, foram analisados os genes responsáveis pela biossíntese da violaceína (*vioABCD*) e os genes *cviR* e *cviI*, por estes estarem envolvidos na regulação do operon *vioABCD* (McClean *et al.*, 1997; Taylor, 1997). A análise se ateve também às regiões do genoma vizinhas aos genes de interesse (regiões de regulação).

As ferramentas utilizadas neste estudo foram aquelas que fazem busca por genes no genoma de procariotos, como o GeneMark (Besemer *et al.*, 1999), e as que fazem busca por regiões de promoção e de regulação da transcrição de genes em bactérias, tais como BPROM – Prediction of bacterial promoters (Walker *et al.*, 2002) e PRODORIC NET - Prokaryotic Database Of Gene Regulation and Regulatory Networks (Münch *et al.*, 2003). Estes programas fazem uma varredura nos genomas de procariotos depositados nos bancos de dados públicos, e são constituídos de algoritmos que buscam por padrões de seqüências (padrão de consenso) os quais correlacionam a funcionalidade dos genes. Dados da anotação (identificação funcional de genes e proteínas) do genoma da *C. violaceum* (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003) também foram explorados, e estão disponibilizados no endereço <http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>.

A análise preliminar dos genes de interesse foi realizada através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) que busca por homologia entre seqüências de aminoácidos e a ferramenta de alinhamento ClustalW (Higgins *et al.*, 1994), que mostra a identidade entre as seqüências submetidas. O produto do gene *cvr* (seqüência da proteína CviR) também foi analisado, neste caso utilizando-se o programa BLAST-PDB, buscando sua homologia estrutural entre as estruturas de proteínas disponibilizadas publicamente no Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000). Os programas Swiss Model e DS ViewerPro v.5.0 foram utilizadas para a modelagem tridimensional de parte da proteína CviR.

Neste trabalho, a rede de regulação do operon *vioABCD* com base no mecanismo de sinalização *quorum sensing* em *C. violaceum* (ATCC 31532) foi representada utilizando o programa *Cell Illustrator* (versão 1.10). *Cell Illustrator* é um ambiente para simulação e representação de sistemas bioquímicos empregando a arquitetura de rede de Petri híbrida.

A Tabela 4.1 resume as ferramentas de bioinformática utilizadas neste trabalho e que estão disponibilizadas publicamente.

Tabela 4.1 Ferramentas de Bioinformática Utilizadas neste Trabalho.

Ferramentas de Bioinformática	Objetivo	Endereço (URL)
BPROM	Busca por região de regulação	<a href="http://www.softberry.com">http://www.softberry.com</a>
PRODORIC NET	Busca por região de regulação	<a href="http://prodoric.tu-bs.de/">http://prodoric.tu-bs.de/</a>
GeneMark	Busca por genes	<a href="http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/">http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/</a>
BLAST	Busca por homologia entre seqüências	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
BLAST-PDB	Busca por homologia estrutural entre seqüências de proteínas	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
ClustalW	Busca por indentidade através do alinhamento entre seqüências homólogas	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
PDB	Busca por homologia entre as estruturas de proteínas depositadas no banco	<a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a>
Swiss Model	Modelo estrutural de proteínas com base na homologia	<a href="http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html">http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html</a>
<i>Cell Illustrator</i> (1.10)	Ambiente para simulação e representação de sistemas bioquímicos empregando a arquitetura de rede de Petri híbrida	<a href="http://www.genomicobject.net">http://www.genomicobject.net</a>



## **4.2 Cinética de Crescimento e Produção de Violaceína por *Chromobacterium violaceum***

Ensaio preliminares de produção de violaceína e crescimento da *C. violaceum* em diferentes fontes de carbono foram realizados em meios líquido e sólido, a fim de avaliar a cinética de produção da violaceína e crescimento celular em diferentes condições de cultivo e possível papel do substrato na regulação da produção de violaceína e seus derivados.

### **4.2.1 Linhagem da Bactéria**

Foram estudadas duas linhagens de *C. violaceum*: a mesma linhagem selvagem utilizada para o sequenciamento do genoma completo (ATCC 12472) e uma mutante de ATCC 31532, denominada de CV026 (Winson *et al.*, 1994). Esta mutante é deficiente na produção de HHL (por repressão do gene *cviI*), e por consequência não produz violaceína. A Tabela 4.2 mostra as linhagens e plasmídeos utilizados neste trabalho e preparo do meio de cultura e estocagem das bactérias estão descritos no Apêndice I.

Tabela 4.2. Linhagens de bactérias e vetores.

Linhagens e vetores	Característica relevante	Referência
<i>Escherichia coli</i> : Mini-Tn5 Km1 (S17-1 $\lambda$ pir)	Cassete <i>luxCDABE</i> , bioluminescente, resistência a Km	Winson <i>et al.</i> (1998)
DH5 $\alpha$ TM		Invitrogen
<i>Chromobacterium violaceum</i> : ATCC 12472	Tipo selvagem – genoma completo	ATCC
ATCC 31532	Tipo selvagem – pouca produção de violaceína	ATCC
CV026	Mini-Tn5 - mutante de ATCC 31532	Winson <i>et al.</i> (1994)
CV017	AHL -, ::Tn5(KmR)::Tn5(HgR) Mini-Tn5 mutante de ATCC 31532 - Indução da produção de violaceína, produção de HHL	McClellan <i>et al.</i> (1997)
Plasmídeo: Pbluescript KS+ pSB401	<i>luxR</i> :: <i>luxI</i> 'CDABE, sensor bioluminescente em presença de AHL de cadeia curta, P15A1 origem, Tc <sup>R</sup>	Promega Winson <i>et al.</i> , (1995)
pSB1075	sensor bioluminescente em presença de AHL de cadeia longa, Tc <sup>R</sup>	Ward <i>et al.</i> , (2002)

AHL-: sem produção de homoserina lactona; Km<sup>R</sup>: resistência à canamicina, Hg<sup>R</sup>: resistência à mercúrio; Tc<sup>R</sup>: resistência à tetraciclina.

#### 4.2.2 Ensaio com ATCC 12472

##### 4.2.2.1 Preparo dos Inóculos

As culturas de *C. violaceum* foram mantidas em placas de Petri contendo agar NB. Para a preparação do inóculo, utilizado nos cultivos subsequentes, coletou-se e transferiu-se uma colônia para 20 mL de meio NB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de

NaCl) em Erlemeyer de 125 mL. A cultura foi mantida sob agitação de 150 rpm a 30°C, durante uma noite.

#### ***4.2.2.2 Cultivo em Meio Líquido***

Dois mililitros do inóculo de *C. violaceum* foram transferidos para 100 mL de meio NB com 1% de glicose ou 1% de glicerol. A cultura foi mantida sob agitação de 150 rpm a 30°C, durante 24 horas. Alíquotas foram retiradas a cada 6 horas para as leituras da densidade óptica e da concentração de violaceína produzida.

#### ***4.2.2.3 Cultivo em Meio Sólido***

Para avaliação da cinética de produção de violaceína pela linhagem ATCC 12472 de *C. violaceum* foram preparados dois meios em NB com agar nutriente (1,5% de agar) contendo glicose 1% ou glicerol 1%. Em cada placa de Petri, contendo aproximadamente 20 mL de meio agar NB foram espalhados 100 µL do inóculo, preparado com descrito no item 4.2.2.1. Foram utilizadas 8 placas com glicose e 8 placas com glicerol, as quais foram incubadas em estufa a 30°C. Em intervalos de 6 horas, duas placas com glicose e duas placas com glicerol foram recolhidas para avaliação da produção de violaceína, até um período total de 24 horas.

#### ***4.2.2.4 Avaliação do Crescimento e Produção de Violaceína***

Assim que coletadas todas as amostras foram congeladas para interromper o metabolismo celular. Obtidas as amostras, ao final de 24 horas de cultivo, procedeu-se a leitura da concentração de biomassa e da concentração de violaceína.

### **Avaliação do Crescimento Celular**

O crescimento celular foi acompanhado durante o cultivo em meio líquido através de leituras de absorvâncias (DO) a 720 nm e as amostragens foram realizadas em intervalos de 6 horas. O acompanhamento do crescimento celular não foi realizado para meio sólido. Para o peso seco da massa celular, utilizou-se a correlação obtida por Antônio (1994), em que o valor médio encontrado foi de 2,9 mg de massa seca/mL de meio, correspondendo a uma absorvância  $A_{720} = 5,85$ . Desta forma, estabeleceu-se que: massa seca =  $(2,9 \times A_{720}/5,85)$  mg/mL.

### **Avaliação da Produção de Violaceína**

A) MEIO LÍQUIDO: Coletou-se 1 mL do caldo de cultura ao qual adicionou-se 1 mL de acetato de etila e agitou-se por inversão do tubo por 1 a 2 minutos. Uma vez que violaceína é solúvel em acetato de etila e que este não é miscível com o meio aquoso, após separação das fases (centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos) recolheu-se a fase orgânica para a leitura da absorvância em 575 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  de absorvância da violaceína,  $\epsilon = 2,97.10^{-2}$  mL. $\mu\text{g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro UV (Retori, 1996)).

B) MEIO SÓLIDO: Raspou-se da superfície das placas o máximo possível de massa celular e transferiu-se para tubos de ensaio. A estes tubos foram adicionados 1 a 2 mL de acetato de etila e agitou-se vigorosamente para extração do pigmento. Os tubos foram deixados em repouso por 20 minutos. Após centrifugação das células a 25000 rpm, coletou-se 1 mL da fase orgânica e procedeu-se a leitura da absorvância a 575 nm. Todos os dados de absorvância foram corrigidos a partir das diluições correspondentes, e convertidos para unidade de concentração.

#### ***4.2.2.5 Cromatografia de Camada Delgada***

Todas as amostras a partir de ATCC 12472 foram submetidas à cromatografia de camada delgada a fim de se investigar precursores da violaceína nos diferentes meios testados. O solvente utilizado foi metanol e o tempo de corrida foi de aproximadamente 40 min.

#### 4.2.2 Influência da Concentração de AHL para Diferentes Fontes de Carbono sobre a Produção de Violaceína por *C. violaceum* (CV026)

CV026 é uma mutante de *C. violaceum* e foi explorada para verificar o estímulo de produção de violaceína em diferentes fontes de carbono (glicose e glicerol) a partir de uma concentração de HHL conhecida. O meio complexo utilizado foi LB com 1% de glicose ou 1% de glicerol. O volume de meio foi de 10mL, distribuídos em tubos centrífuga. A redução do volume do meio foi necessária para descartar desperdícios do composto HHL. Com o inóculo, foram adicionadas HHL sintético nas concentrações de 0,1 a 0,22 µg/mL a partir do volume total. Neste caso, as amostras foram retiradas na fase estacionária de crescimento, onde há uma densidade populacional de bactérias suficiente para a comunicação celular por mecanismo *quorum sensing*. As moléculas de homoserina lactonas foram sintetizadas na Universidade de Nottingham, no mesmo laboratório onde esta pesquisa foi realizada. Tais compostos foram mantidos em solução de acetonitrila para manter sua estabilidade.

#### 4.3 Estudo da regulação do operon *vioABCD* através de mutagênese

Para o estudo das possíveis regiões gênicas envolvidas na regulação da expressão do operon *vioABCD* foram produzidas mutantes de *C. violaceum* (ATCC 12472) através da inserção aleatória de transposons (Winson *et al.*, 1998) no genoma de *C. violaceum* (ATCC 12472) foi a estratégia adotada neste estudo para desvendar as regiões de regulação do operon *vioABCD*. As linhagens e vetores utilizados neste estudo são apresentados na Tabela 4.2 e o procedimento para estocagem das linhagens está descrito no Apêndice I.

### 4.3.1 Mutação por Transposição

Os transposons utilizados nas mutações são derivados de mini-Tn5 *luxCDABE* e foram construídos pelo grupo de pesquisadores da Universidade de Nottingham (Winson *et al.*, 1998).

Os vetores mini-Tn5 *luxCDABE*, carregam o operon dos genes *lux*, que são os genes responsáveis pela luminescência em espécies de bactérias marinhas. A intensidade de luminescência no organismo selvagem é controlada por sinalização celular (*quorum sensing*), e confere vantagens de sobrevivência à espécie. Para verificarmos regiões de regulação da produção de violaceína, a linhagem sequenciada de *C. violaceum* (ATCC 12472) foi submetida a mutações por inserção aleatória de mini-Tn5 *luxCDABE* no seu genoma, conferindo luminescência ao mutante. A Figura 4.1 mostra o mini-Tn5 contendo o cassette *lux* conferindo resistência a canamicina, utilizado neste estudo para a construção das mutantes de *C. violaceum*. Este derivado mini-Tn5 confere expressão constitutiva dos genes *lux*, causado pelo promotor do gene Km e foi construído através da inserção do cassette *luxCDABE* (sítio de restrição para *NotI*) em pUT mini-Tn5 Km1 (Winson *et al.*, 1998).

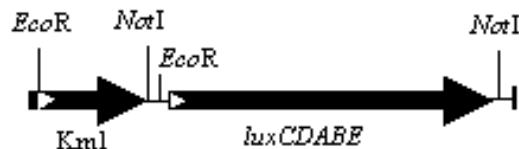


Figura 4.1. Construção de mini-Tn5 contendo os genes *lux* conferindo resistência à canamicina (Winson *et al.*, 1998).

A seleção dos mutantes foi feita utilizando uma câmara de detecção de luminescência (Luminograph LB 980– EG&G Berthold, disponível no *Institute of Infection Immunity and Inflammation*-Universidade de Nottingham). Através de técnicas de clonagem e de sequenciamento de fragmentos de DNA, foram investigadas as regiões regulatórias que detêm o controle da produção de violaceína na linhagem ATCC 12472.

### 4.3.2 Construção das Mutantes de *Chromobacterium violaceum*

#### 4.3.2.1 Transformação por Conjugação

A transformação da linhagem selvagem ATCC 12472 foi feita por conjugação. Conjugação envolve a transferência de um plasmídeo móvel de uma célula para outra célula através da mistura de linhagens, um doador e um receptor. O doador escolhido foi uma linhagem de *E.coli* (S17-1  $\lambda$ pir) carregando um plasmídeo suicida (pUT mini-Tn5) com o cassete *luxCDABE* e um marcador que confere resistência ao antibiótico canamicina (Figura 4.1). A linhagem S17-1  $\lambda$ pir foi utilizada por ser essencial para a propagação de plasmídeos que contém origem de replicação R6K, como vetores pUT mini-Tn5. A principal característica de linhagens  $\lambda$ pir é conter o gene  $\lambda$ pir, que codifica a proteína  $\pi$ . O plasmídeos que contém origem de replicação R6K requerem a proteína  $\pi$ , que é específica para R6K e podem ser mantidos somente em hospedeiros que produzem tal proteína.

As Tabelas 5.1-5.4 (Veja item 5.7 no Capítulo de Resultados e Discussão) mostram a resposta de *E.coli* e *C. violaceum* diante dos antibióticos testados em diferentes concentrações. A partir destes resultados optou-se por canamicina e brometo de etídio como agentes seletivos após a conjugação. *C. violaceum* possui um gene que a confere resistência a brometo de etídio (*emrE*), composto extremamente tóxico, mas que foi extremamente eficiente como agente seletivo para obtenção das mutantes de *C. violaceum*.

Culturas de cada linhagem cresceram em 10 mL de meio complexo LB. Para o caso do doador, foi adicionado no meio 50  $\mu$ g/mL de antibiótico canamicina. As culturas de *E.coli* (doador) foram mantidas a 37°C, enquanto que as culturas de *C. violaceum* (receptor) foram mantidas à temperatura de 30°C. O tempo de crescimento foi de uma noite.

A partir das culturas crescidas por uma noite, coletou-se amostras de 1,5 mL do doador e do receptor, as quais foram centrifugadas em microtubos a 14.000 rpm por 1 minuto. Após descartar o sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de LB fresco. Novamente, as amostras foram centrifugadas por mais 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de LB fresco. Cinquenta mililitros do doador e do receptor foram misturados cuidadosamente em microtubo. O volume total de 100  $\mu$ L foi transferido para o centro de uma placa contendo meio LB Agar. Esta amostra foi

então mantida em estufa a temperatura de 30°C por 6 horas (tempo da conjugação). Depois teste período, a amostra seca no centro da placa foi então removida por raspagem e transferida a um microtubo contendo 1 mL de LB. Após agitação vigorosa até obter solução homogênea (*vortex*), as células conjugadas foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 1 minuto. Após descartado o sobrenadante, a amostra foi ressuspensa em 500 µL de LB fresco.

Uma diluição em série (100 µL, 50 µL, 1/10 µL, 1/100 µL) foi espalhada em placas com LB agar contendo 50 µg/mL de Km e 30 µg/mL de brometo de etídeo, escolhidos como agentes seletivos (Figura 4.2).

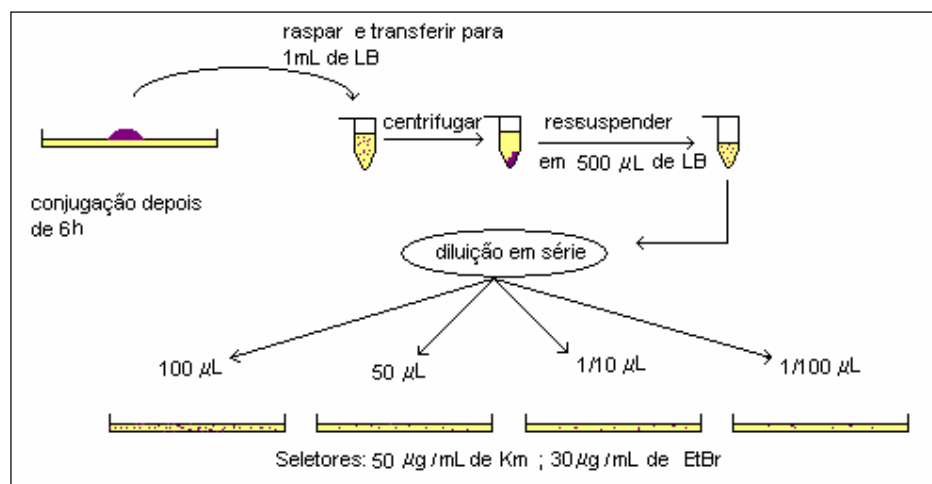


Figura 4.2. Esquema da transformação por conjugação e diluição em série. Km: canamicina; EtBr: brometo de etídio.

#### 4.3.2.2 Seleção de Colônias Mutadas

Após uma noite de repouso, foram coletadas as colônias resistentes ao antibiótico canamicina e ao brometo de etídio nas concentrações ideais. A seleção das colônias foi feita a partir do fenótipo marcante em *C. violaceum*. A pigmentação violeta foi uma vantagem para se selecionar as mutantes. Colônias incolores e violetas que sobreviveram ao meio eram mutantes, trazendo no seu genoma a inserção de mini-Tn5 *luxCDABE*. Portanto, as mutantes violetas e despigmentadas além de resistentes à canamicina e brometo de etídio,



apresentavam luminescência (detectada na câmara luminescente: Luminograph LB 980–EG&G Berthold). Colônias incolores foram coletadas para estudar os genes que regulam a produção de violaceína em *C. violaceum*. Destaca-se em cada conjugação realizada, mais de cinquenta por cento das colônias existentes na placa apresentavam bioluminescência, indicando a inserção do transposon. Inicialmente 10 mutantes (pigmentadas e despigmentadas) foram coletadas das quais 5 foram selecionadas para este estudo (CVm1, CVm3, CVmA5, CVmA6, CVmB8). Tais mutantes produzem menos violaceína que a linhagem selvagem, o que caracteriza a repressão do operon *viaABCD* causado pela inserção do transposon em regiões gênicas envolvidas na biossíntese de violaceína.

### 4.3.3 Manipulação de DNA

#### 4.3.3.1 Extração de DNA Cromossomal

Obtidas as mutantes, extraiu-se o DNA cromossomal para que as amostras fossem submetidas à digestão por enzimas de restrição. O método é descrito a seguir.

Amostras das mutantes foram inoculadas em 100 mL de meio LB em Erlemeyer de 200 mL de volume total. As culturas foram deixadas por uma noite sob agitação de 130 rpm e a 30°C. Após este período, foram coletadas amostras de 50 mL e transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugadas a 7.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram lavadas e ressuspensas com 9,25 mL de TE, 0,5 mL de SDS a 10% e 40 µL de proteinase K na concentração de 25 mg/ml. Após misturar a solução gentilmente, as amostras foram colocadas em estufa a temperatura de 37°C até quebra da membrana celular. Em intervalos de aproximadamente 10 minutos, as amostras foram misturadas cuidadosamente para facilitar ao rompimento das células. Após o rompimento celular, adicionou-se 1,8 mL de NaCl 5M e misturou-se bem. Adicionou-se 1,5 mL de solução de CTBA (Cetyl Trimetil Ammonium Bromide - Brometo de Cetil Trimetil Amônio) e misturou-se gentilmente a amostra (a solução de CTBA foi pré-aquecida a 65°C antes de adicioná-la a amostra). A solução foi incubada a 65°C, por 20 minutos. Após este período de incubação, adicionou-se igual volume (13,5 mL) de clorofórmio. A amostra foi misturada e submetida à centrifugação a 7.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa

(sobrenadante) foi transferida para outro tubo plástico a qual adicionou-se 2-propanol até 60% a partir do volume total da fase aquosa transferida e misturou-se cuidadosamente. Neste estágio observou-se a precipitação de DNA (Figura 4.3). A fibra de DNA formada foi transferida gentilmente a um microtubo contendo 1 mL de etanol 70% com o auxílio de uma pipeta Pasteur com a ponta em forma de um gancho.



Figura 4.3. Precipitação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) – mutante de ATCC 12472.

Após homogeneização a amostra foi centrifugada a 9.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi centrifugado novamente por alguns segundos para remover o excesso de etanol. Em seguida a amostra foi deixada em repouso para a total evaporação de etanol. Finalmente o precipitado foi solubilizado em 400  $\mu$ l de água ultra pura até obter uma solução homogênea e pouco densa. Quando a solução não ficou homogênea, a amostra foi incubada a 65°C durante alguns minutos até que o DNA fosse solubilizado. Este procedimento possibilitou a obtenção de uma solução de DNA mais concentrada do que a obtida a partir de *kits* de extração (Figura 4.4). O preparo das soluções de CTAB e TE estão descritos em Apêndice II.

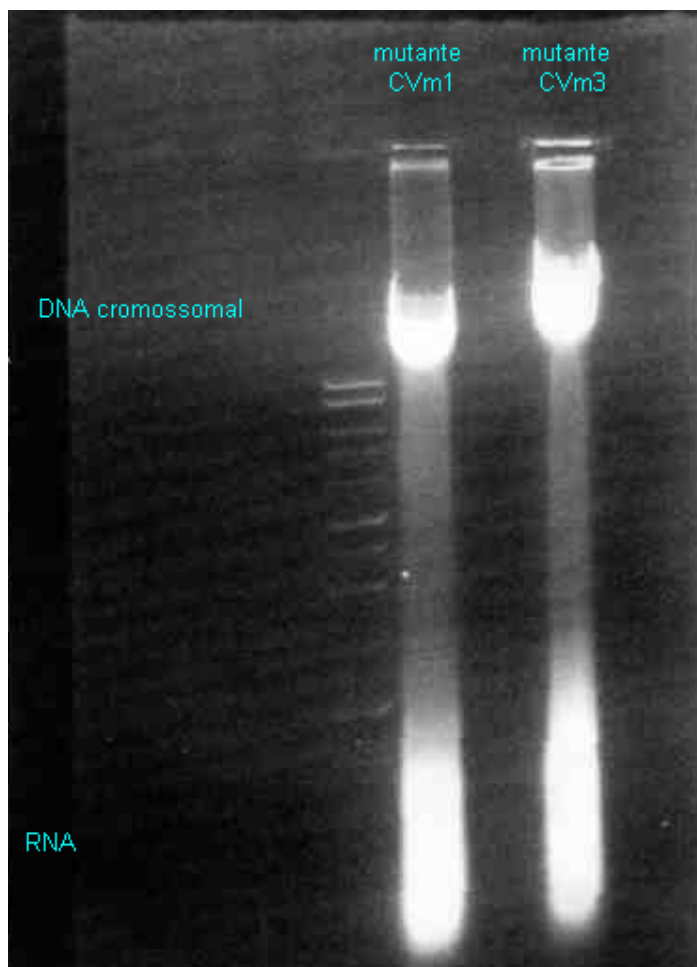


Figura 4.4. Eletroforese de DNA cromossomal extraído das mutantes CVm1 e CVm3 em gel agarose (1%) e corado por brometo de etídeo. Marcador de 1 kb, Promega.

#### ***4.3.3.2 Extração de DNA Plasmideal***

DNA plasmideal foi rotineiramente extraído através de lise alcalino de células, utilizando o *kit* comercial Qiagen (Quiagen Ltd. Surrey, UK), seguindo o protocolo dos fabricantes. Essencialmente, 1,5 mL de células a partir de uma cultura crescida por uma noite foram lisadas em meio alcalino. O DNA plasmideal foi separado utilizando-se coluna de adsorção com uma micromembrana de sílica gel que tem afinidade e detém o DNA. Esta técnica permite que amostras puras de DNA possam ser extraídas rapidamente e eluídas em um determinado volume de TE ou água ultra pura.

#### 4.3.3.3 Digestão Parcial de DNA Cromossomal

O DNA cromossomal das mutantes foi digerido utilizando-se a enzima *san3AI* e solução tampão adquiridos da Promega (Madson, USA). A digestão parcial foi a estratégia adotada para se obter diferentes fragmentos de DNA, buscando otimizar as chances de se obter a região contendo a inserção do transposon, que é aleatória. A digestão parcial foi feita através de uma diluição em série da enzima de restrição para um determinado tempo de reação. O método é esquematizado na Figura 4.5.

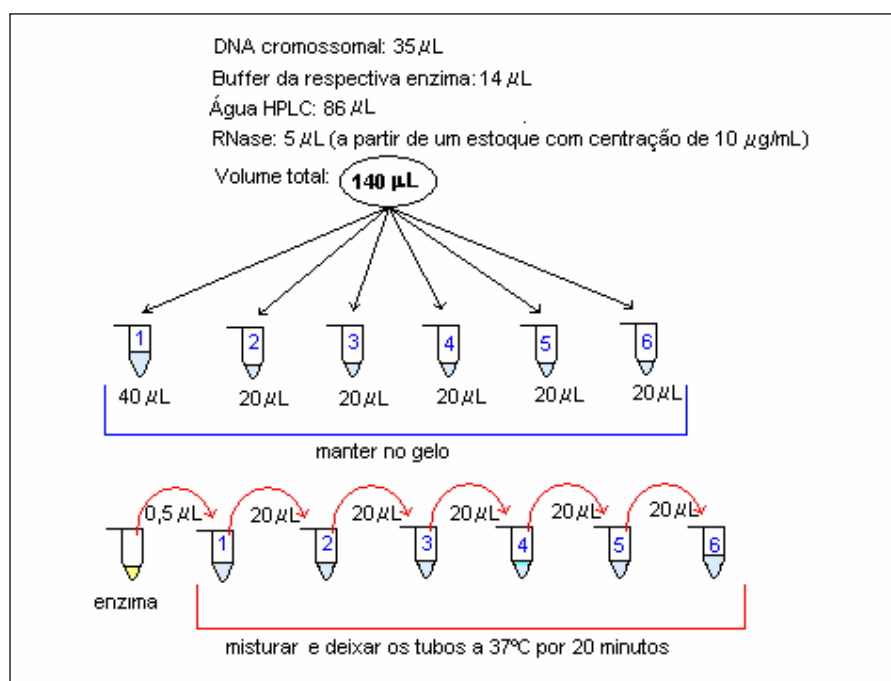


Figura 4.5. Digestão parcial de DNA cromossomal através de diluição enzimática em série. Diluições: tubo 1: 1/80; tubo 2: 1/160; tubo 3: 1/320; tubo 4: 1/640; tubo 5: 1/1280; tubo 6: 1/2560.

A enzima *San3AI* tem uma sequência de corte de 4 pares de base e a concentração da solução enzimática de estoque utilizada foi de 100 u (3-10 u/µL). Após a digestão do DNA, analisaram-se os fragmentos de DNA digeridos através de eletroforese. As amostras submetidas à purificação e a ligação com o vetor pBluescript, foram aquelas que eram mais concentradas, que apresentavam bandas mais definidas (geralmente amostras dos tubos 4, 5 e 6, como pode ser visto na Figura 4.6).

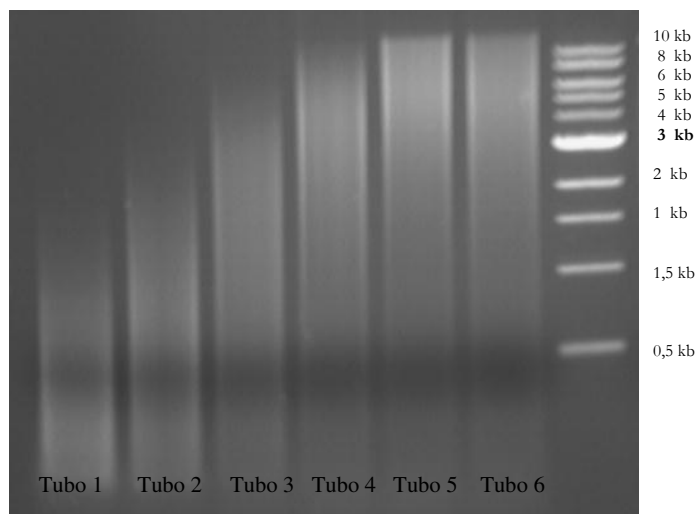


Figura 4.6. Eletroforese do produto de digestão parcial de DNA cromossomal a partir de uma diluição enzimática em série. 1% de gel agarose, marcador de 1 kb (Promega).

#### 4.3.3.4 Digestão de DNA Plasmideal

A digestão de DNA plasmideal foi rotineiramente seguida utilizando-se as seguintes proporções de reagentes: 3  $\mu$ L de DNA plasmideal, 3  $\mu$ L de solução tampão (3 vezes o volume total), 0,5  $\mu$ L de enzima e 23,5  $\mu$ L de água HPLC. O tempo de digestão foi de 2 horas. Após, as amostras foram completadas com solução tampão até um volume total de 30  $\mu$ L para fazer a corrida do gel.

O vetor utilizado para fazer a clonagem dos fragmentos de DNA das mutantes foi o pBluescript. A enzima utilizada para a digestão do plasmídeo foi a *Bam*HI (2500 u – 10u/ $\mu$ L), que tem uma sequência de corte de 6 pares de bases. A Tabela 4.3 mostra a sequência de corte das enzimas utilizadas para digestão de DNA cromossomal e plasmideal. A complementaridade entre os pares de bases **GATC/CTAG** proporciona a ligação do fragmento de DNA cromossomal ao DNA plasmideal.

Tabela 4.3. Enzimas de Restrição e Respectivas Sequências de Corte.

Enzima	Seqüência de Corte
<i>Bam</i> HI	GGATCC
	CCTAGG
<i>Sau</i> 3AI	GATC
	CTAG

A Figura 4.7 mostra o vetor PBluescript digerido com *Bam*HI (tempo de 2 horas), utilizado para ancorar o fragmento de DNA cromossomal das mutantes de *C. violaceum* (ATCC 12472).

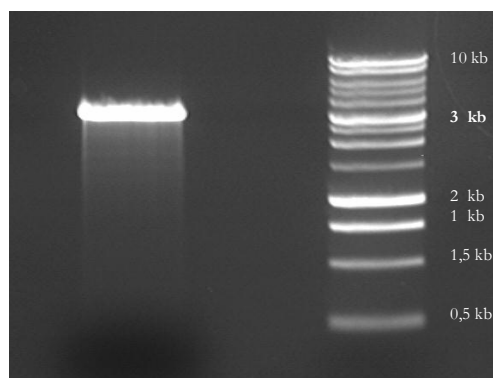


Figura 4.7. Eletroforese de pBluescript (KS+) digerido com *Bam*HI. Marcador de 1Kb, Promega.

#### 4.3.3.5 Eletroforese em Gel Agarose dos Fragmentos de DNA

Agarose adquirida da Promega (Madison, USA) foi diluída (0,75-1%) em solução tampão 1 x TAE (Apêndice I), e brometo de etídio foi adicionado ao final de concentração de 1 µg/mL. Os fragmentos de DNA foram detectados em bandas fluorescentes usando trans-iluminador UV. Os tamanhos de fragmentos foram identificados utilizando-se os marcadores padrão de DNA (Promega).

#### ***4.3.3.6 Purificação de Amostras de DNA Plasmideal e Cromossomal***

A purificação de DNA foi realizada utilizando-se o *kit* comercial QIAquick PCR purification (QIAGEN Handbook). Basicamente a amostra de DNA foi retida em micro-membrana de uma coluna de adsorção e lavada com uma solução de etanol. A eluição foi feita com água HPLC.

#### ***4.3.3.7 Ligação do DNA Cromossomal e Plasmideal Digeridos***

DNA plasmideal (pBluescript-vetor) e cromossomal (fragmento de DNA da mutante-inserção) foram ligados através de incubação em gelo por uma noite, nas seguintes proporções:

Vetor (pBluescript):	1 µL
DNA inserido:	10 µL
Solução tampão:	2 µL
T4 DNA ligase (Promega):	0,7 µL
H <sub>2</sub> O:	7,3 µL
Volume total:	20 µL

#### **4.3.4 Clonagem**

Após a ligação, o procedimento segue com o objetivo de se obter clones com os fragmentos de DNA das mutantes inseridos no vetor. A clonagem foi feita em *E. coli* e o procedimento é descrito a seguir.

#### 4.3.4.1 Transformação por Eletroporação

##### Preparo de células competentes

Células de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) foram cultivadas durante uma noite em meio LB a 37°C e em agitação (200 rpm). Um determinado volume da cultura crescida por uma noite foi transferido para um Erlenmeyer de 200 mL de volume total com 100 mL de LB fresco. O volume de cultura transferido foi o suficiente para se obter 1% do inóculo em relação ao volume total ( $OD_{600}=0,1$ , 1% do volume total). A amostra foi incubada sob agitação de 200 rpm, a 37°C e as células cresceram até se chegar na fase exponencial de crescimento ( $OD_{600}=0,6-0,8$ ), o que levou um período de aproximadamente 3 horas. Cinquenta mililitros de cultura de células foram submetidos à centrifugação e lavagem em 10% de glicerol (v/v), como esquematizado na Figura 4.8.

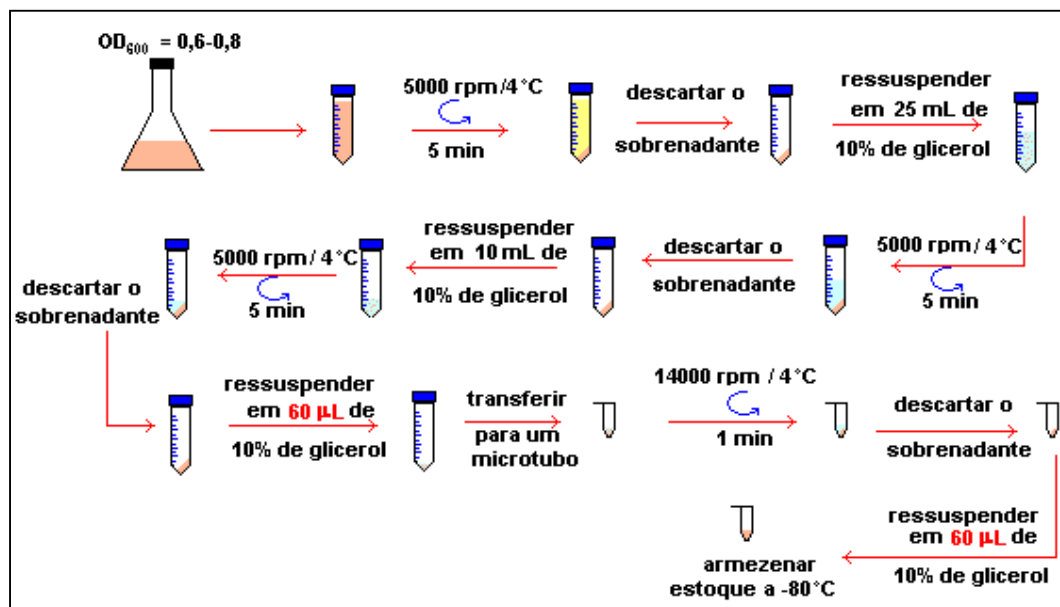


Figura 4.8. Preparo de células competentes de *E. coli*.



## Preparo de DNA e condições de transformação

O DNA a ser transformado sofreu processo de diálise por 30 minutos em um filtro de disco miliporos (Millipore Ltd. Watford, UK) sobre água HPLC. 10  $\mu\text{L}$  de alíquota foram misturados a 10  $\mu\text{L}$  de células competentes e transferidos para a cubeta de eletroporação (0,2 cm). As células foram transformadas por eletroporação (Bio-Rad Micropulser <sup>TM</sup>) e o equipamento foi ajustado para 2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$  e 200  $\Omega$ . Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de LB na cubeta, revigorando as células transformadas. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Fez-se uma diluição em série e as amostras diluídas foram espalhadas em placas com LB agar contendo o antibiótico canamicina (Km, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), X-GAL (5-bromo-4-cloro-3 indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, substrato cromogênico para  $\beta$ -galactosidase) e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo, indutor do operon *lac*) como agentes seletivo. As placas foram incubadas durante uma noite a 37°C. As colônias transformantes (de 1 a 6 colônias) foram coletadas e cultivadas em meio LB líquido (10 mL), contendo Km, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após uma noite, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmideal e análise eletroforética em gel de agarose.

### 4.3.5 Seqüenciamento de DNA

#### 4.3.5.1 Preparação do Molde (Template)

DNA clonado a ser seqüenciado foi extraído de uma cultura de 10 mL utilizando-se o *kit* comercial Qiagen (item 4.3.4.2). A eluição foi feita com 30  $\mu\text{L}$  de água HPLC.

#### **4.3.5.2 Análise Computacional do DNA Sequenciado**

O molde de DNA foi seqüenciado em um seqüenciador automático, no Hospital Universitário Queens Medical Centre, The University of Nottingham, UK. Iniciadores universais (*universal primers*) M13F (*forward* - direto) e M13R (*reverse* - reverso) foram utilizados para o sequenciamento das amostras de DNA.

### **4.4 Identificação de Moléculas Sinais *Quorum Sensing* Produzidas por *Chromobacterium violaceum* e suas Mutantes**

#### **4.4.1 Bioensaio N-AHL**

##### **4.4.1.1 Bioensaio I – Indução de Violaceína**

Este é um teste simples para ensaios com moléculas AHL e é baseado na sua habilidade de induzir ou reprimir a produção de violaceína na mutante de *Chromobacterium violaceum* (ATCC 31532), CV026. Cultivou-se o biorrepórter (CV026) em 10 mL de meio líquido LB, contendo canamicina (50 µg/mL), durante uma noite a 30°C e com agitação de 150 rpm. Cem microlitros da cultura foi adicionada a 3 mL de Soft-top agar (Apêndice I), mantido à temperatura de aproximadamente 40°C, não muito superior a esta para não destruir o biorrepórter. Um volume de 3 mL foi cuidadosamente vertido sobre uma placa contendo agar LB com canamicina (50 µg/mL). Após geletificação do Soft-top agar, as placas foram perfuradas utilizando-se uma pipeta Pauster. Aos orifícios formados adicionou-se 50 µL de LB mais 10 µL de uma solução contendo AHL ou extrato de sobrenadante de um caldo de cultivo a ser testado (Figura 4.9). Como controle positivo, 5 µL de molécula AHL sintética (1 mg/mL de HHL) foram adicionados a uma das perfurações. As placas foram mantidas a 30°C durante uma noite. A atividade de AHL foi detectada através da pigmentação violeta ao redor das perfurações no agar.



Figura 4.9. Indução de violaceína em CV026 quando AHL de cadeia curta está presente no meio.

Alternativamente, o teste “T” foi realizado previamente por oferecer uma resposta rápida (Figura 4.10). Neste caso o biorrepórter foi estriado com uma alça formando uma linha horizontal em um dos lados da placa contendo LB e antibiótico apropriado, quando necessário. A linhagem a ser testada para verificação de produção de AHL foi então estriada formando uma linha vertical no centro da placa a partir da linha superior do biossensor, de forma que as culturas das duas linhagens não sejam tocadas. As linhas formam então um “T” na placa e, se houver moléculas AHL na linhagem testada, estas se difundirão até o biorrepórter (CV026) e induzirão a produção de violaceína na área cruzada. CV026 responde a AHL de cadeia de 4 a 8 carbonos (C4-C8, com ou sem o grupo de substituição oxo), não respondendo a AHL de cadeia longa.

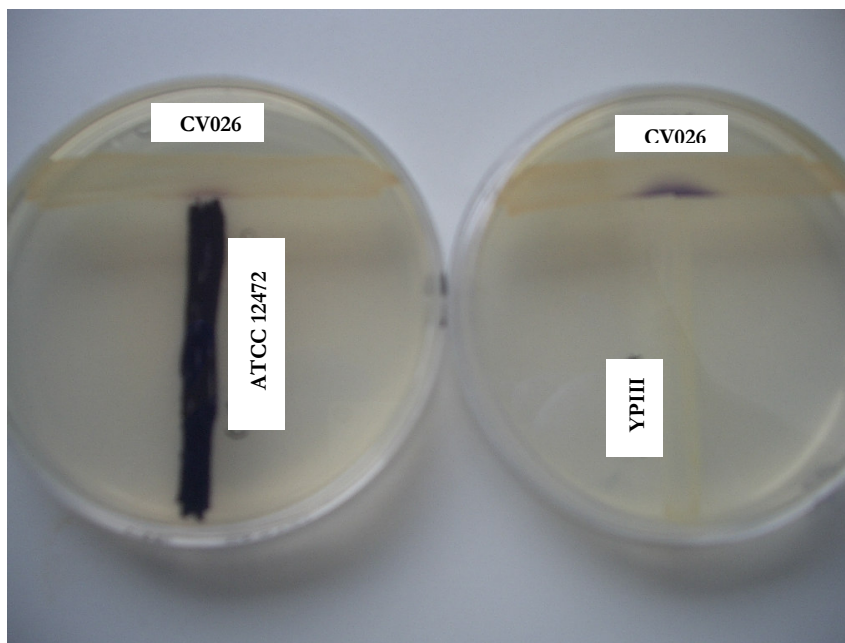


Figura 4.10. Teste T para verificação de presença de AHL de cadeia curta por teste T usando CV026 como biorrepórter (controle positivo YPIII: *Yersinia pestis*).

#### 4.4.1.2 Bioensaio II – Inibição de Violaceína

O ensaio de inibição de violaceína é similar ao descrito no item 4.4.1.1, exceto que o biossensor utilizado é outra mutante de ATCC 31532 (CV017), que produz violaceína de forma constitutiva, e produz mais violaceína em relação à linhagem selvagem. Neste caso, 5  $\mu$ L do controle positivo (1 mg/mL de AHL sintética de 10 a 14 carbonos) é adicionado nas perfurações. Ocorrerá inibição do pigmento violeta ao redor das perfurações que conter AHL de cadeia longa nas frações e o fundo permanecerá violeta, realçando assim o contraste de coloração.

#### 4.4.1.3 Bioensaio III – Indução de Bioluminescência

Este ensaio também detecta a presença de AHLs por sua habilidade em induzir a bioluminescência em linhagens de *E. coli* contendo o plasmídeo pSB401 e o plasmídeo pSB1075 (pSB 401 – indução de bioluminescência específica para AHL de cadeia curta; pSB

1075 – indução de bioluminescência específica para AHL de cadeia longa), mostradas na Tabela 4.2. A metodologia utilizada foi similar ao item 4.4.1.1, diferindo com relação ao biossensor utilizado. *E. coli* (pSB401) foi utilizada para detecção de AHL de cadeia curta (C4-C8, com ou sem o grupo de substituição oxo), como CV026, e pSB1075 foi utilizada para detecção de AHL de cadeia longa (C10-C14), com ou sem o grupo de substituição oxo). *E. coli* carregando o plasmídeo pSB401 leva aproximadamente 2 horas para induzir a bioluminescência na presença de AHL, enquanto que *E. coli* carregando o plasmídeo pSB1075 leva aproximadamente 24 horas para que ocorra a indução. Após o período de indução de cada biossensor, as placas são colocadas na câmara luminescente (Luminograph LB 980 – EG&G Berthold) para detectar a luminescência nas frações. As frações que continham AHL foram luminescentes. Utilizando este teste foi possível detectar AHL de cadeia longa ou curta, utilizando os diferentes biossensores.

#### **4.4.1.4 Bioensaio IV – Cromatografia de Camada Delgada**

A técnica de cromatografia de camada delgada de fase reversa foi utilizada para identificação de homoserina lactonas de cadeia longa e curta utilizando também biossensores. Para a identificação de AHL de cadeia curta, utilizou-se folha de alumínio coberta com sílica do tipo RP18 (fase reversa) e o biorrepórter *E. coli*-pSB401 e para a identificação de AHL de cadeia longa utilizou-se folha de alumínio coberta com sílica do tipo RP2 (fase reversa) e o biorrepórter *E. coli*-pSB1075. O procedimento é descrito a seguir.

Amostras de AHL extraídas da cultura de *C. violaceum* (item 4.4.1.5) foram aplicadas na folha TLC (*Thin Layer Chromatography*) a partir de 2,5 cm da base da folha e com uma distância de aproximadamente 2,5 cm entre uma amostra e outra. O volume de amostra aplicada foi de 10 µL e o volume de AHL sintética padrão utilizado foi de acordo com a concentração (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Concentração e volume de AHL padrão utilizado em TLC.

AHL sintética	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Cadeia curta		
HC6	100	10
HC8	100	10
OC8	10	10
OC6	1	10
OC4	1000	5
C6	10	5
Cadeia longa		
C10	1000	5
C12	1000	5
C14	1000	5
OC10	10	5
OC12	1	5
OC14	100	5

HC6: N-(3-hidroxi-hexanoil)-L-homoserina lactona (HHHL); HC8: N-(3-hidroxi-octanoil)-L-homoserina lactona (HOHL); OC8: N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona (OOHL); OC6: N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL); OC4: N-(3-oxobutanoil)-L-homoserina lactona (OBHL); C6: N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL); C10: N-(decanoil)-L-homoserina lactona (DHL); C12: N-(dodecanoil)-L-homoserina lactona (dDHL); C14: N-(tetradecanoil)-L-homoserina lactona (tDHL); OC10: N-(oxodecanoil)-L-homoserina lactona (ODHL); OC12: N-(oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL); OC14: N-(3-oxo-tetradecanoil)-L-homoserina lactona (OtdDHL).

A corrida da cromatografia levou o período de 16 horas para testes com AHL de cadeia longa e o solvente utilizado foi metanol/água na proporção de 45:55 (v/v). O tempo da corrida da cromatografia para testes de AHL de cadeia curta foi de 4 horas e o sistema de solventes utilizados foi mesmo (metanol/água) diferindo na proporção, que foi de 60:40 (v/v).

Após o tempo necessário para a cromatografia, a folha TLC foi seca e gentilmente colocada em um suporte retangular de acrílico (badeja). Um volume de 160 mL de meio Soft top agar foram misturados com 10 mL de biorrepóter (pSB401 para AHL de cadeia curta e pSB1075 para teste de AHL de cadeia longa) e adicionados gentilmente sobre a folha de TLC. As bandejas foram incubadas por uma noite e depois foram analisadas na câmara luminescente.

#### **4.4.1.5 Extração de AHL de *Chromobacterium violaceum***

Para extrair moléculas homoserinas lactonas, 50 mL de uma cultura de *C. violaceum* cultivada por uma noite em meio LB com 50 mM de MOPS (pH 7,0) foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi separado e transferido para um funil de decantação. Cem mililitros de diclorometano foram adicionados e a solução foi agitada para garantir boa mistura (a cada agitação, abrir a válvula para a despressurização). A solução foi deixada em repouso por 20 minutos para a separação de fases. Geralmente, quando há muita produção de violaceína (típico de uma cultura da linhagem ATCC 12472), obtém-se uma emulsão, o que dificulta a separação. Neste caso, agitou-se novamente a solução e uma segunda centrifugação foi realizada para que houvesse uma melhor separação das fases. Depois de centrifugada, as duas fases foram transferidas para o funil de decantação e a fase inferior foi retirada e reservada em um Erlemeyer de 500 mL. A fase superior da solução (LB e residual de solvente) foi retirada e descartada adequadamente. A fase reservada no Erlemeyer foi transferida para a pêra de decantação e novamente foi submetida a uma segunda extração com mais 100 mL de diclorometano. A solução foi agitada da mesma forma e submetida a repouso para a separação das fases. A fase inferior foi retirada e adicionou-se sulfato de magnésio para absorver a água no meio. Após seca e filtrada, a solução foi transferida para um balão de vidro de 200 mL e foi concentrada em rota-vapor até total evaporação do solvente. Moléculas AHL foram redissolvidas em 1 mL de acetonitrila, adicionado em duas porções de 500 µL, para facilitar a recuperação da amostra. A solução foi transferida para um frasco de vidro de 1,5 mL e foi submetida à secagem com fluxo de nitrogênio. Após secagem, a amostra foi ressuspensa em 100 µL de acetonitrila e armazenada a -20°C.

#### **4.4.1.6 Purificação da Molécula de Indução por HPLC**

As amostras de moléculas AHL foram purificadas através de uma coluna HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) semi-preparativa de fase reversa, como detalhado a seguir:

Coluna HPLC : Kromasil KR100 C6, 250 x 2,1mm (Hichrom Ltd.)

Fase móvel : acetonitrila/água (mistura variável, 20-100%; v/v)

Detecção : UV; 210 nm

Fluxo da fase móvel: 0,14 mL/min

As amostras de AHL foram ressuspensas em 100 µL de acetonitrila. Amostras de 50 µL foram injetadas na coluna e foram coletadas a cada 5 ou 6 minutos. A primeira fase móvel continha 70% (v/v) de acetonitrila e sete frações (F1-F7) foram coletadas nos tempos mostrados na Tabela 4.5. Diferentes moléculas sintéticas de AHL também foram avaliadas e o tempo de retenção de cada molécula serviu como referencial para as amostras testadas.

Tabela 4.5. Frações de AHL obtidos da coluna HPLC e tempos de retenção.

Fração	Tempo de retenção (min)	AHL padrão
F1	0 - 5,5	HC4, OC4
F2	5,5 - 11	HC6, OC6, C4
F3	11 - 17	C6, HC8, OC6
F4	17 - 22	HC10, OC10, C8
F5	22 - 26	HC12, OC12, C10
F6	26 - 32	C12, OC12, OC14, HC14
F7	32 - 42	C14

A fração final incluiu 100% de acetonitrila para lavar a coluna (10-15 min). As sub-frações foram secas e ressuspensas em 100 µL de acetonitrila. A atividade de indução foi obtida utilizando-se o bioensaio descrito no item 4.4.1.



# Capítulo 5 - Resultados e Discussão

A seguir serão apresentados os resultados deste estudo, que são baseados em dados obtidos através do uso de ferramentas de bioinformática e experimentos utilizados em biologia molecular de microrganismos. Primeiramente serão apresentados os resultados obtidos com base na homologia e estrutura dos genes homólogos aos genes responsáveis pelo mecanismo *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas (família *luxI/luxR*), por esta ser uma das formas de regulação da biossíntese de violaceína. As estratégias moleculares experimentais neste trabalho nos permitiram obter as primeiras mutantes da linhagem ATCC 12472 e a partir delas foi possível explorar outros genes de regulação, além do operon *vioABCD* e dos genes *cviI* e *cviR*. Foram feitas caracterizações de moléculas indutoras AHL, responsáveis pela regulação *quorum sensing*, na linhagem selvagem de *C. violaceum* e em suas mutantes, derivadas da transposição do operon *luxABCDE* com o gene que confere resistência à canamicina, como marcador.

## 5.1 Análise de CviR e CviI com Base na Homologia entre Sequências

Como apresentado no Capítulo 3, CviR é produto do gene *cviR* e é uma proteína regulatória que atua em nível transcricional na expressão de genes controlados pelo mecanismo *quorum sensing* em *C. violaceum*. Aspectos funcionais da proteína CviR foram analisados a partir da sua homologia estrutural. A proteína CviR da linhagem ATCC 12472 tem 265 aminoácidos e de acordo com o resultado do BLAST-PDB apresenta dois principais domínios: uma região N-terminal entre os resíduos 40 e 180, na qual um auto-indutor se liga, e uma região C-terminal (de aproximadamente 50 resíduos) entre os resíduos 200 e 250, caracterizado por um domínio hélice-alça-hélice (*helix-turn-helix*, HTH). O domínio HTH é comum em proteínas regulatórias (também chamadas de reguladores transcricionais e têm a função de se acoplar ao DNA para auxiliar a RNA polimerase durante a transcrição de um ou de vários genes. Este domínio caracteriza a homologia com as proteínas regulatórias da família Lux, como por exemplo a proteína LuxR (regulador transcricional na *V. fischeri*) e a proteína TraR (regulador transcricional na *Agrobacterium*

*tumefaciens*). Estas proteínas apresentam um domínio HTH na região C-terminal com aproximadamente 41 resíduos em LuxR (Trott e Stevens, 2001) e 65 resíduos em TraR (Fuqua *et al.*, 1996). A função do domínio HTH é de interagir com o sítio do DNA (próximo à região promotora), estimulando o contato com a RNA polimerase (Wintiens e Rooman, 1996).

O produto de *cviI* é uma enzima (CviI) responsável pela síntese de homoserina lactona (homoserina lactona sintetase). Submetendo-se a sequência de aminoácidos de CviI ao BLASTp (BLAST para análise de proteínas), verificou-se que CviI apresenta homologia, com alta similaridade com a LasI (e-value =  $5e-18$ ), que também pertence à família LuxI. De acordo com evidências experimentais elucidadas na literatura (Moré *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1998; Val e Cronan, 1998; Parsek *et al.*, 1999), é amplamente aceito que S-adenosilmetionina (SAM: S-adenosyl methionine) e um derivado de ácido graxo são necessários para a biossíntese de homoserina lactona por homólogos LuxI. Portanto, é bem provável que para produzir a molécula indutora (N-haxanoil-L-homoserina lactona ou HHL) em *C. violaceum* (linhagem ATCC 31532), CviI dependa destes mesmos substratos.

## 5.2 Predição da Estrutura 3D da Proteína Regulatória CviR

Como CviR apresenta homologia com alta similaridade com proteínas regulatórias de acordo com os resultados do BLAST (e-values entre  $1e-19$  e  $2e-8$ ), e parece estar envolvida na regulação de biossíntese de violaceína (McClean *et al.*, 1997; Taylor, 1997), é de interesse conhecer a sua estrutura, uma vez que a funcionalidade da proteína está intimamente relacionada à sua conformação estrutural. Como a estrutura de CviR ainda não foi determinada experimentalmente, buscou-se predizer a sua estrutura 3D, ou parte dela, a partir da sequência de seus aminoácidos. Para isto utilizou-se o programa Swiss-Model (Suwede *et al.*, 2003), uma ferramenta que gera as coordenadas da estrutura tridimensional de uma proteína a partir de sua sequência, usando um homólogo estrutural como molde para gerar a estrutura modelo. O molde utilizado pelo programa Swiss-Model foi a proteína regulatória GerE (um homólogo estrutural encontrado a partir dos resultados do BLAST-PDB), cuja estrutura foi determinada experimentalmente e está depositada no PDB (Protein Data Bank) sob o código 1fseB. A proteína regulatória GerE foi utilizada como molde para

gerar a estrutura 3D porque apresenta maior similaridade estrutural com CviR (e-value =  $3e-06$ ) do que as demais estruturas homólogas disponíveis no PDB. A GerE atua como regulador transcricional na formação de esporos de *Bacillus subtilis* (Ducros *et al.*, 2001). A partir das coordenadas geradas pelo Swiss-Model, utilizou-se o programa DS ViewerPro v.5.0 para prever graficamente a estrutura tridimensional predita de CviR (Figura 5.1).

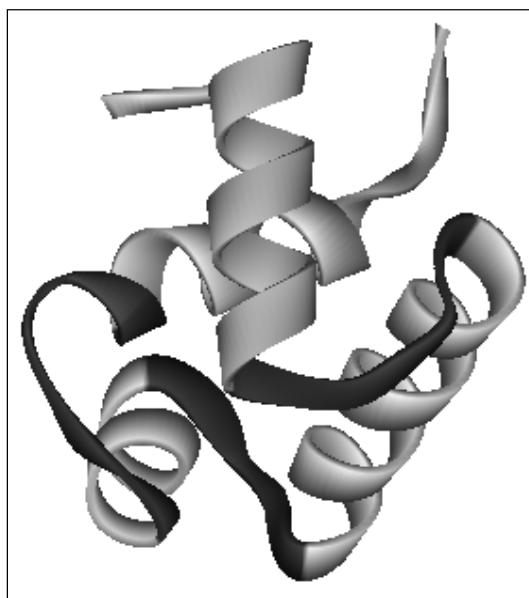


Figura 5.1 Modelo Estrutural 3D proposto para CviR. Em preto é indicado o domínio C-terminal HTH.

A Figura 5.1 apresenta três regiões HTH em CviR destacadas em preto e é este domínio que caracteriza a interação com o DNA (Wintiens *et al.*, 1996). A estrutura 3D predita foi avaliada através do gráfico de Ramachandran (Ramachandran, 1969), utilizando-se o programa Procheck v.3.5.4 (Laskowski *et al.*, 1993) para a validação estrutural (Figura 5.2).

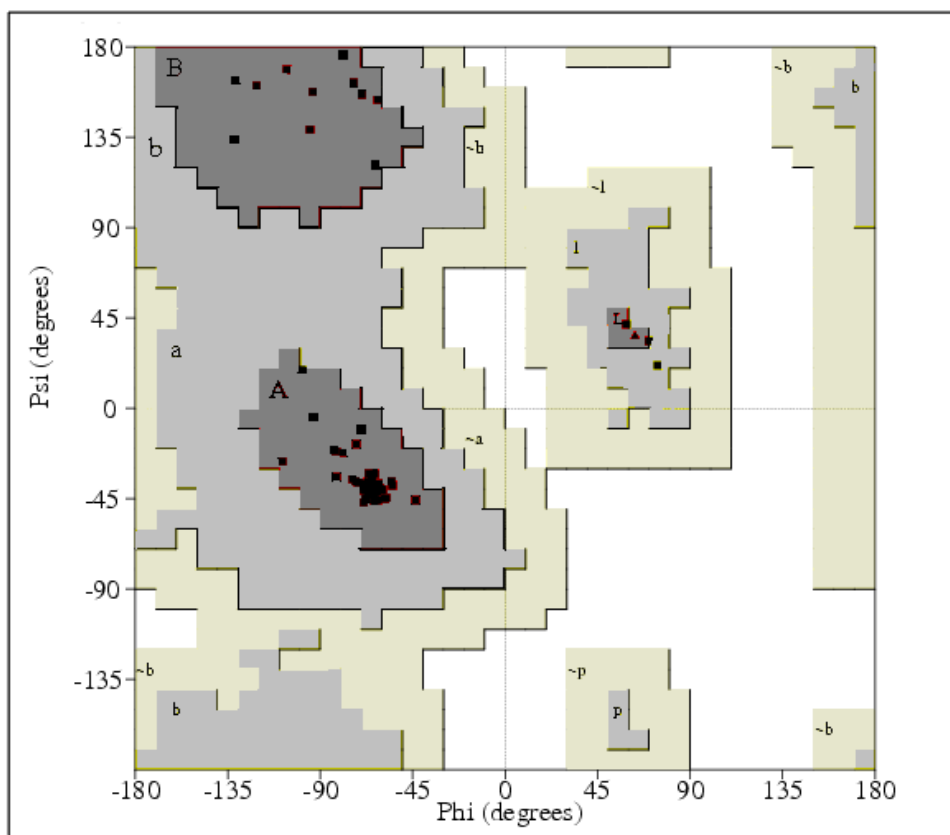


Figura 5.2. Resultado da avaliação da estrutura 3D de CviR pelo Procheck. Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]: 96,7%; resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]: 3,3%.

De acordo com o resultado do programa Procheck, a estrutura da proteína predita apresenta uma boa qualidade estereoquímica, apontando que 96,7% dos resíduos encontram-se na região favorável do gráfico de Ramachandran. O resultado deste programa baseia-se na análise de 118 estruturas de no mínimo 2,0 Ångstroms de resolução e com fator-R não maior do que 2,0%. Um modelo de boa qualidade deve ter mais de 90% dos resíduos nas regiões favoráveis.

### 5.3 Alinhamento entre a Seqüência Modelo e a Seqüência de CviR

A estrutura predita, gerada a partir do molde homólogo de CviR, contém 66 resíduos de aminoácidos. A fim de identificar os resíduos preditos pelo modelo 3D, utilizou-se o programa ClustalW para realizar um alinhamento entre a seqüência do modelo estrutural e a seqüência de CviR (Figura 5.3.)

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

seq1_CviR      MVTSKPINARPLPAGLTASQQWTLLEWIHMAGHIETEGELKAFLDNILSQAPSDRIILVL  60
seq2_model     -----

seq1_CviR      GRLNNQNQIQRMKVLNVSYPSDWLNQYSQENFAQHDPIMRIHLGQGPVIWEERFSRAKG  120
seq2_model     -----

seq1_CviR      SEEKRFIAEASSNGMGSGITFSAASDRNNVGSILSIGGKEPGRNAALVAMLNCLTPHLHQ  180
seq2_model     -----

seq1_CviR      AAVRIANLPPASPSNMPLSQREYDIFHWMSRGKTNWEIATILNISERTVKFHVANVIRKL  240
seq2_model     -----NMPLSQREYDIFHWMSRGKTNWEIATILNISERTVKFHVANVIRKL  46
                  *****

seq1_CviR      NANNRTHAIVLGMHLAMTPRELVNG  265
seq2_model     NANNRTHAIVLGMHLAMTPR-----  66
                  *****

```

Figura 5.3 Alinhamento entre a seqüência modelo e a seqüência de CviR utilizando o programa ClustalW. seq1\_CviR: seqüência de aminoácidos de CviR; seq\_2model: seqüência de aminoácidos do modelo da estrutura de CviR.

O resultado do alinhamento mostra que há identidade entre a seqüência modelo (estrutura predita de CviR), e a região C-terminal da seqüência de aminoácidos de CviR, entre os resíduos 195 e 260. Estes resíduos estão na região apontada como domínio HTH pelo resultado do BLAST-PDB. Portanto, o modelo tridimensional de CviR prediz um domínio HTH, uma característica determinante no papel da proteína regulatória, que é o de interagir com o sítio do DNA e estimular a RNA polimerase no processo transcricional.

### 5.4 Mecanismo de Regulação do Operon *vioABCD*

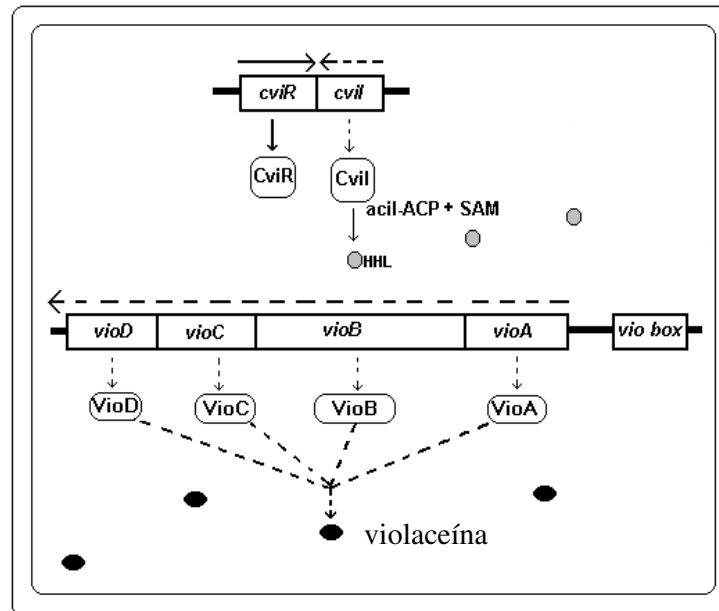
A partir dos resultados baseados na homologia funcional presente nas proteínas da família Lux, e de resultados experimentais para a linhagem de *C. violaceum* ATCC 31532, os

quais apontam que a violaceína é produzida quando os genes *cviI* e *cviR* são expressos (McClean *et al.*, 1997; Taylor, 1997), um modelo de regulação do operon *vioABCD* foi esquematizado (Figura 5.4), baseado na regulação da bioluminescência do *V. fischeri* (Engebrecht e Silverman; 1994).

A Figura 5.4 apresenta um esquema proposto para a regulação de expressão do operon *vioABCD* pelo mecanismo *quorum sensing*. A produção de violaceína deve ocorrer em nível basal quando há baixa produção de N-hexanoil-L-homoserina lactona (Figura 5.4A) e é estimulada em função de altas concentrações de HHL no meio celular (Figura 5.4B), produzidas por células vizinhas.

## A. Baixa concentração de HHL

Célula



## B. Alta concentração de HHL

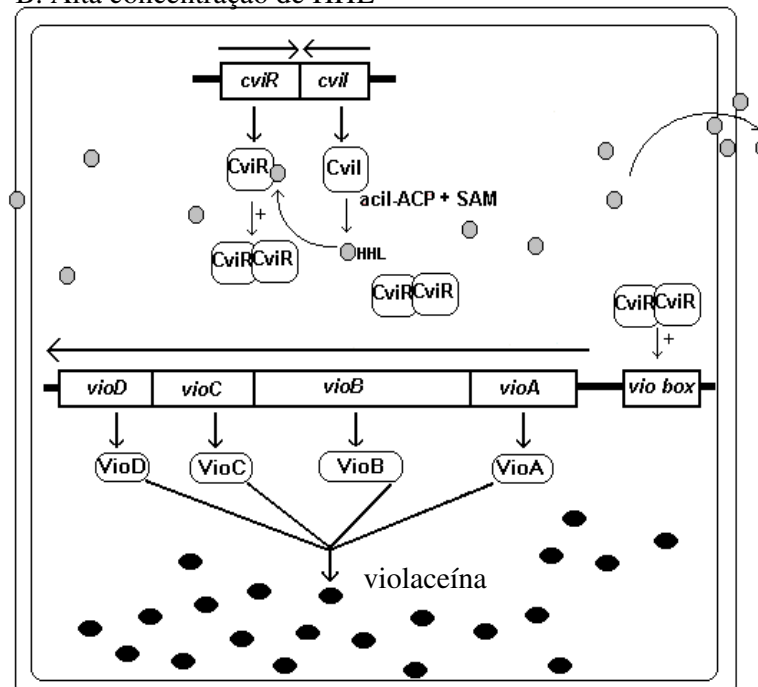


Figura 5.4 Proposta da regulação do operon *vioABCD* por mecanismo de sinalização *quorum sensing* (A: o operon *vioABCD* é expresso em níveis basais quando há baixa concentração de HHL no meio; B: a expressão do operon *vioABCD* é induzida quando há altas concentrações de HHL no meio). Acil-ACP: proteína carregadora do grupo acil; SAM: S-adenosil metionina.

Resultados dos estudos de Taylor (1997) sugerem que uma das formas de regulação da expressão do operon *vioABCD* ocorreria através do gene *cviR*. Embora a forma de regulação em nível de controle transcricional da proteína regulatória CviR (produto do gene *cviR*) nunca tenha sido estudada, acredita-se que a proteína CviR sofra modificação de sua conformação estrutural (uma possível dimerização) quando se liga à HHL, similar ao que ocorre com seu homólogo TraR (Qin *et al.*, 2000). Para garantir a ligação de CviR à molécula indutora, seria necessário que houvesse alta concentração de HHL no meio intra ou intercelular, a qual é sintetizada pela enzima CviI (produto da expressão de *cviI*). Altas concentrações de moléculas homoserina lactonas estão relacionadas à alta densidade celular ou número (*quorum*) de bactéria (Fuqua *et al.*, 1996). A mudança conformacional de CviR é o que provavelmente favorece a interação da região C-terminal de CviR com o sítio do DNA próximo à região promotora (denominada neste trabalho de *vio box*), estimulando a transcrição do operon *vioABCD*. Os dados da anotação do genoma da *C. violaceum* disponíveis publicamente (ATCC 12472), bem como o programa PRODORIC NET foram utilizados para encontrar a região de promoção do operon *vioABCD* (Figura 5.5).

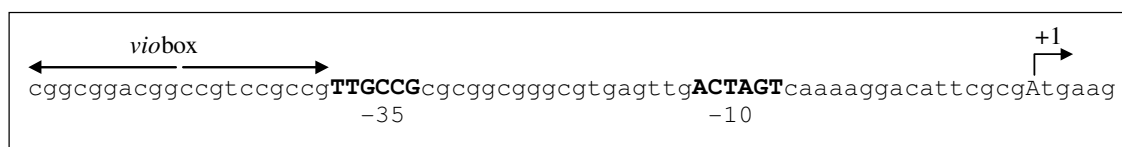


Figura 5.5 Região de promoção do operon *vioABCD*. Em letras maiúsculas, destacam-se os padrões de consenso que caracterizam a região promotora box -35 e box -10. O início transcricional é indicado na posição +1 (para o códon ATG).

Acredita-se que a região *vio box* seja o sítio onde ocorre a ligação de CviR com o DNA e que está próxima à região promotora (próxima à região de consenso TTGCCC, a -46 pb a partir do início da transcrição do operon, que é indicado pela posição +1), mas por enquanto não há dados experimentais que evidenciem sua posição exata. É possível que *vio box* seja uma repetição invertida, como encontrado para a *lux box*, a qual foi caracterizada como uma sequência de 20 pb com repetição invertida, centrada na posição -42,5 pb a partir do início da transcrição (Kristi e Greenberg, 1999). Os trabalhos que definitivamente ilustraram que a presença da molécula indutora era necessária para um homólogo LuxR foi primeiramente realizado com a proteína TraR (Zhu e Winans, 1999; Zhu e Winans, 2001).



Ensaio utilizando a técnica de *footprinting* de DNase I mostraram que dímeros TraR, ligados a moléculas de homoserina lactona, se ligam especificamente a uma sequência do tipo *lux* box, conhecida como *tra* box. A proteína TraR dimerizada torna-se mais estável e mais resistente às proteases, o que garante sua interação no sítio do DNA. Neste caso, é bem possível que um dímero de CviR se acople à região *vio* box. Choi e Greenberg (1991) trabalharam com uma mutante de LuxR, truncada na região N-terminal, chamada de LuxRΔN que, apresentou atividade de interação com DNA, independente de estar ligada à molécula indutora. Estes autores sugerem que quando a subunidade N-terminal de LuxR não está ligada à molécula indutora, isto dificulta a região C-terminal de se ligar ao DNA.

## 5.5 Cinética de Crescimento de *Chromobacterium violaceum* e Produção de Violaceína

Os resultados de ensaios cinéticos de crescimento de *C. violaceum* (ATCC 12472) e produção de violaceína (Figuras 5.6 e 5.7) realizados mostram que quando a bactéria é cultivada em meio contendo glicose como fonte de carbono, a produção de violaceína é baixa e a produção de biomassa é alta. Já quando a bactéria é cultivada com glicerol como fonte de carbono, a concentração de biomassa é menor, mas há uma produção de violaceína significativamente maior, quando comparada com os dados contendo glicose no meio de cultivo. Percebe-se que a produção de violaceína não está relacionada à alta densidade celular (dados obtidos em presença de glicose), uma vez que uma maior produção de pigmento é obtido para uma população menor de células, como ocorre em presença de glicerol. Dados de crescimento celular de *C. violaceum* em glicerol revelam um tempo maior para a fase de adaptação, entrando em fase exponencial depois de 18 horas de cultivo. Já em presença de glicose, a fase exponencial se inicia a partir de 6 horas de cultivo (Figura 5.6).

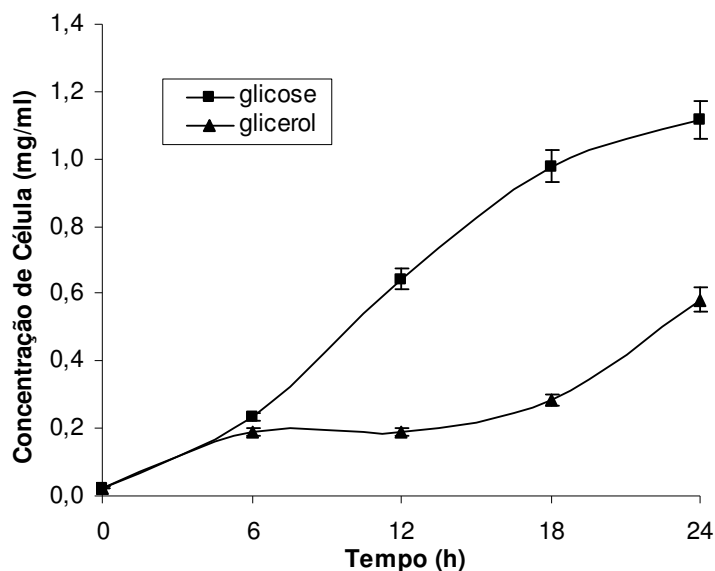


Figura 5.6 Cinética do crescimento celular de *C. violaceum* ( ATCC 12472) cultivada em meio líquido (NB) utilizando 1% de glicose ou de glicerol como fontes de carbono. A bactéria foi cultivada em uma temperatura 30°C e sob agitação para manter a oxigenação do meio. Os dados representam a média de uma amostragem realizada em duplicata.

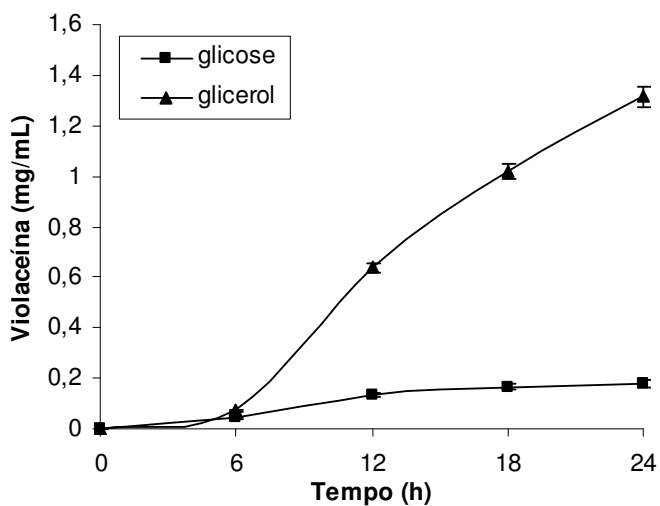


Figura 5.7 Cinética da produção de violaceína. *C. violaceum* (ATCC 12472) foi cultivada em meio sólido (NB) utilizando 1% de glicose ou de glicerol como fontes de carbono e a temperatura foi mantida a 30°C. A concentração de violaceína foi obtida a partir da massa de violaceína produzida na placa para um volume de 25 mL de meio LBA. Os dados representam a média de uma amostragem realizada em duplicata.

Os resultados dos cromatogramas apresentados nas Figuras 5.8 e 5.9 são referentes ao cultivo de *C. violaceum* em meio sólido com glicose ou glicerol. A cromatografia de camada delgada revela a presença de diferentes precursores metabólitos em função das fontes de carbono (Figura 5.9), o que demonstra que, dependendo da fonte de carbono utilizada, pode ocorrer o estímulo da produção de outros metabólitos, e repressão de violaceína. Uma vez produzida pouca ou quase nenhuma violaceína, não há produção de desoxiviolaceína, o que indica que o pigmento minoritário é um metabólito que depende de altas concentrações de violaceína para ser produzido, fazendo parte da mesma via biossintética, como esquematizado no trabalho de August e colaboradores (2000).

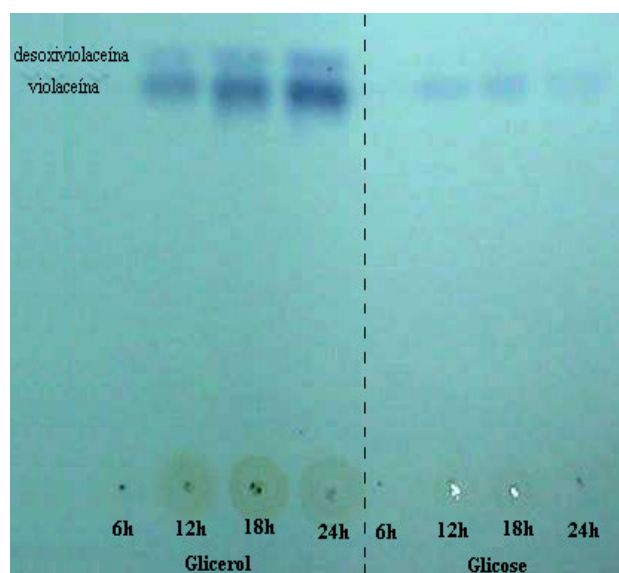


Figura 5.8 - Cromatografia em camada delgada (cinética em meio sólido).

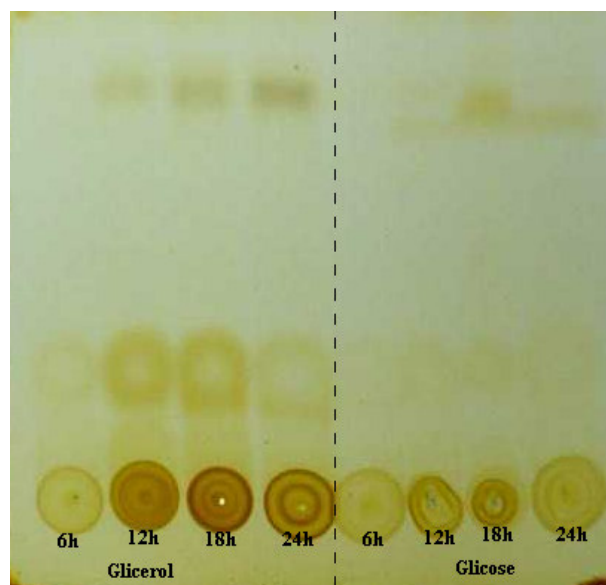


Figura 5.9 Cromatografia de camada delgada de extrato de pigmento produzidos por *C. violaceum* (ATCC 12472) em meio sólido na presença de glicose e glicerol revelado com iodo gasoso.

## 5.6 Influência da Concentração de AHL na Produção de Violaceína em CV026

A mutante de ATCC 31532 (CV026) é deficiente na produção de HHL por causa da mutagênese por inserção transposicional de mini-Tn5 no gene *cviI* (Winson *et al.*, 1994), e por esta razão não produz violaceína. Quando AHL de cadeia curta é adicionada ao meio de cultivo, a produção de violaceína é restaurada. O composto natural que estimula a produção de violaceína na linhagem selvagem de *C. violaceum* (ATCC 31532) é HHL (N-hexanoil-L-homoserina lactona) e portanto esta molécula é o indutor que melhor interage com a proteína regulatória CviR nesta linhagem, controlando a expressão do operon *vioABCD* por mecanismo *quorum sensing* (Taylor, 1997; McClean, 1997). As Figuras 5.10 e 5.11 mostram a influência da concentração de HHL na produção de violaceína e crescimento celular depois de 16 horas de cultivo de CV026 para diferentes fontes de carbono testadas (glicose e glicerol). Visto que as cinéticas de produção de violaceína em

presença de glicose e glicerol, apresentado na Figura 5.7, mostram uma diminuição da produção de violaceína quando *C. violaceum* (linhagem selvagem ATCC 12472) é suprida com glicose como fonte de carbono, um ensaio similar foi feito com a mutante CV026, que é deficiente na produção de HHL, a fim de verificar se o mecanismo *quorum sensing* é a única forma de regulação da produção de violaceína sob condições ideais de cultivo. Embora uma baixa concentração de HHL seja necessária para ativar a produção de violaceína em CV026 seja, em torno de  $3 \times 10^{-8} \text{M}$  (Martinelli *et al*, 2004), neste caso adicionaram-se concentrações maiores de HHL (maior que  $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ), para garantir e verificar a restauração da produção de violaceína diante da saturação de HHL em meio com glicose ou glicerol.

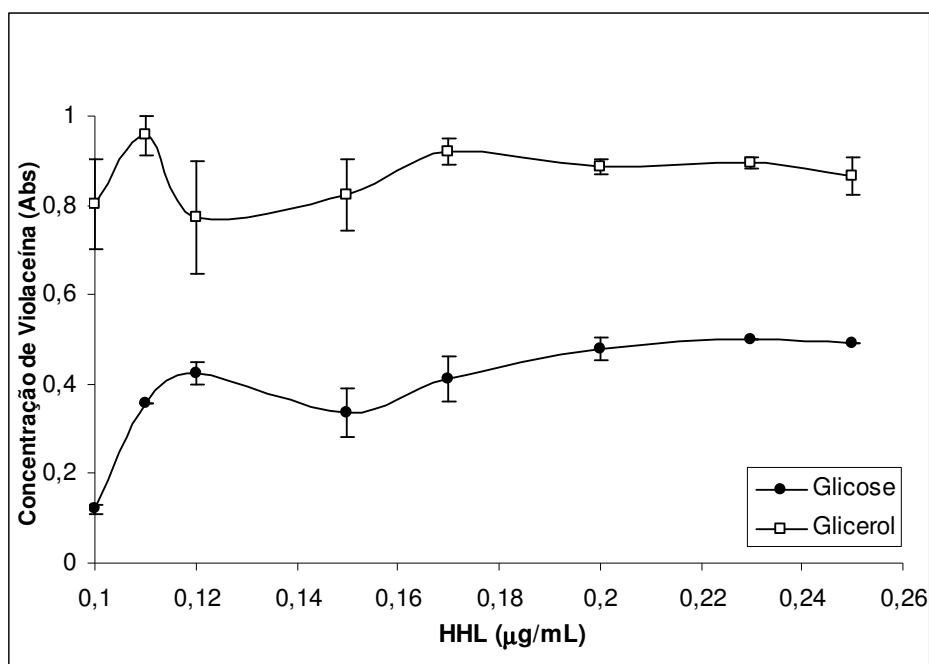


Figura 5.10. Influência da concentração de HHL na produção de violaceína em CV026 utilizando diferentes fontes de carbono. Meio LB com 1% de glicose ou 1% de glicerol, após cultivo de 16 h e temperatura de 30°C (Absorbância lida a 570 nm). Os pontos experimentais representam a média de dados obtidos em triplicata.

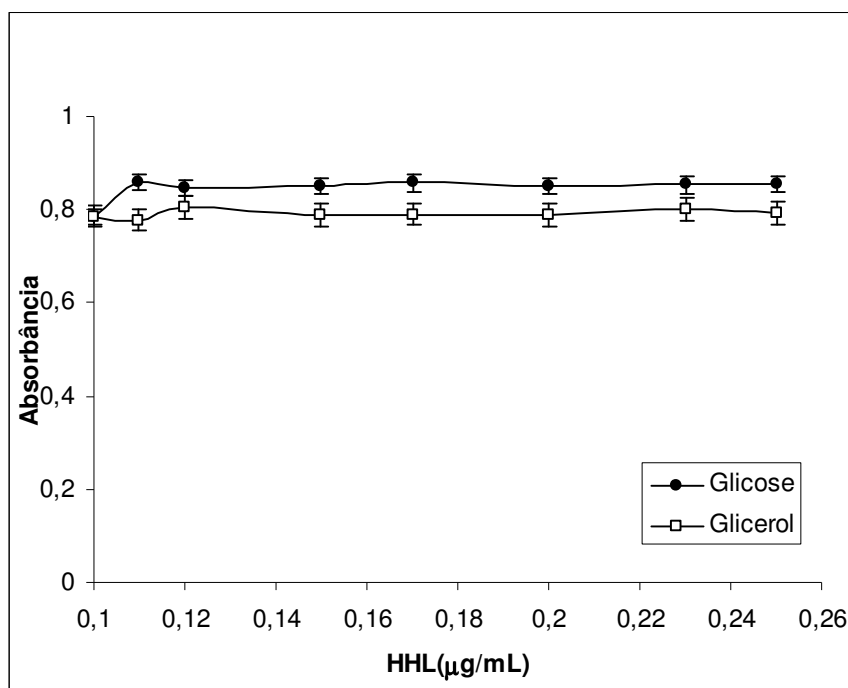


Figura 5.11. Influência da concentração de HHL na densidade celular de CV026 utilizando diferentes fontes de carbono. Meio LB com 1% de glicose ou 1% de glicerol, tempo de cultivo de 16 h e temperatura de 30°C (Absorbância lida a 720 nm).

Os dados mostrados na Figura 5.10 sugerem que a partir de 0,11 µg/mL de HHL em meio com glicerol e de 0,12 µg/mL de HHL em meio com glicose, a concentração de violaceína não varia significativamente e que não há efeito inibitório de produção de violaceína nas concentrações de HHL testadas. Nota-se que há influência na produção de violaceína quanto à fonte de carbono disponível, independente da concentração de HHL. Em presença de glicose ocorre uma nítida repressão da produção do pigmento, enquanto que em presença de glicerol a concentração de violaceína é em torno de 2 vezes maior, para uma mesma concentração de HHL disponível.

A concentração celular não foi alterada pela faixa de concentração de HHL testada. Na fase estacionária de crescimento (depois de 24 horas de cultivo) percebe-se que a biomassa não é alterada pelo aumento da concentração de HHL (Figura 5.11).

Estes dados (Figuras 5.6-5.11) sugerem que o mecanismo de sinalização *quorum sensing* não é a única forma de regulação da produção de violaceína. Como abordado no Capítulo 3 (item 3.2), mecanismos regulatórios de ativação, atenuação e repressão podem atuar em conjunto, sendo comuns na transcrição de operons responsáveis por uma via

metabólica, o que confere uma resposta rápida da bactéria sob flutuações no meio ambiente, garantindo sua sobrevivência. É possível que a indução da produção do pigmento violeta necessite também do cAMP e de sua proteína receptora (CAP) para ativar a transcrição de *cviR*, de forma análoga ao que ocorre para induzir a bioluminescência em *V. fischeri* (Dunlap, 1989) (Figura 5.12). Esta hipótese explicaria por quê a violaceína não é induzida em altas densidades celulares mesmo em presença de uma concentração de saturação de HHL, quando cultivada em glicose como fonte de carbono. Acredita-se que a ativação transcricional de *cviR* ocorra quando os níveis de glicose são baixos, controlada através dos níveis intracelulares de cAMP. Em altos níveis de glicose há baixos níveis de cAMP na célula, diminuindo os níveis do ativador transcricional CAP-cAMP. Portanto, em altos níveis de glicose, a produção de CviR ocorre em nível basal, o que reflete na expressão basal do operon *vioABCD* e conseqüente menor produção de violaceína, mesmo quando há suficiente concentração de HHL no meio.

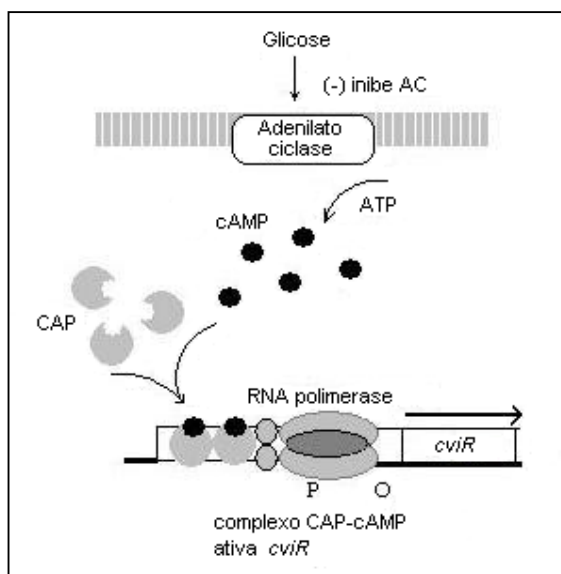


Figura 5.12 Modelo hipotético da ativação do gene *cviR* pelo complexo cAMP-CAP em *C. violaceum*.

A Tabela 5.1 apresenta os prováveis genes responsáveis pelo regulador transcricional CAP ou (CRP – proteína receptora de cAMP).

Tabela 5.1. Genes que podem ter como produto o regulador transcricional CRP em ATCC 12472.

Gene	Produto da ORF
CV0738	provável regulador transcricional CRP/ família Fnr
CV2708	provável regulador transcricional CRP/ família Fnr
CV2987	provável regulador transcricional CRP/ família Fnr
CV3647	provável proteína, regulador transcricional CRP/ família Fnr

Fnr diz respeito à família de proteínas que regulam a redução de nitrato e fumarato (fumarate and nitrate reduction regulatory protein) e estão envolvidas no metabolismo energético (<http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>).

## 5.7 Seleção de Antibióticos para a Construção das Mutantes de *Chromobacterium violaceum*

A mutação de *C. violaceum* (linhagem seqüenciada no projeto genoma – ATCC 12472) foi realizada através de conjugação como apresentado no item 4.3.2 do Capítulo 4. Para se obter a seleção das colônias mutadas após a conjugação, vários antibióticos foram testados na linhagem selvagem de *C. violaceum* (receptor) e também em *E.coli* (S17-1), doador do vetor carregando o mini-Tn5 *luxCDBAE*, como apresentado nas Tabelas 5.2-5.4.



Tabela 5.2. Teste de Resistência a Antibióticos para *Chromobacterium violaceum* e *Escherichia coli* em Placa de Disco.

Antibióticos	Concentração (µg/mL)	Linhagem	
		S17-1 (Tn5)	ATCC 12472
Ampicilina	10	+	+
Penicilina	10	+	+
Gentamicina	10	+	-
Eritromicina	15	-	-
Tetraciclina	30	-	-
Cloranfenicol	30	-	-
Cotrimoxazol	25	+	-

S17-1 (Tn5): linhagem de *E. coli*, hospedeiro do vetor plasmidial com a inserção de mini-Tn5 *luxCDABE*.  
(+) resistência ao antibiótico; (-) sensibilidade ao antibiótico.

Tabela 5.3. Resistência a Antibióticos para *C. violaceum* e *E. coli* (Meio Sólido, Placas).

Antibióticos	Concentração (µg/mL)	Linhagem	
		S17-1 (Tn5)	ATCC 12472
Rifampicina	10	+	+
	20	+	+
	30	-	+
	50	-	+
	100	-	+
	150	-	+
	200	-	+
Eritromicina	50	+	+
	100	-	+
	150	-	+
Brometo de Etídio	10	+	+
	15	-	+
	20	-	+
	25	-	+

S17-1(Tn5): linhagem de *E. coli*, hospedeiro do vetor plasmidial com a inserção de mini-Tn5 *luxCDABE*.  
(+) resistência ao antibiótico ou ao brometo de etídeo; (-) sensibilidade ao antibiótico ou ao brometo de etídeo.

Tabela 5.4. Teste de Resistência a Antibióticos para *C. violaceum* e *E. coli* (Meio Líquido).

Antibióticos	Concentração (µg/mL)	Linhagem	
		S17-1(Tn5)	ATCC 12472
Ampicilina	50	+	+
	100	+	+
	150	+	+
Tetraciclina	10	-	-
	50	-	-
	100	-	-
Canamicina	<b>50</b>	+	-
	100	+	-
	150	+	-
Cloranfenicol	50	+	-
	100	+	-
	150	+	-
Estreptomicina	50	+	-
	100	+	-
	150	+	-
Ácido nalidíxico	15	+	-
	30	-	-
	45	-	-
Vancomicina	50	+	+
	75	+	+
	100	-	+
	150	-	+
Eritromicina	50	-	+
	75	-	-
	100	-	-
	150	-	-
Rifampicina	50	-	+
	100	-	-
	150	-	-
	200	-	-
Carbamicina	20	+	+
	50	+	+
	100	+	-
	150	+	-
Brometo de Etídio	1	+	+
	10	+	+
	<b>30</b>	-	+
	60	-	+

S17-1 (Tn5): linhagem de *E. coli*, hospedeiro do vetor plasmidial com a inserção de mini-Tn5 *luxCDABE*. (+) resistência ao antibiótico ou ao brometo de etídio; (-) sensibilidade ao antibiótico ou ao brometo de etídio. Em negrito destacam-se as concentrações ótimas dos agentes seletivos para a seleção das mutantes.

Os resultados mostram a sensibilidade de *E. coli* e *C. violaceum* (ATCC 12472) nas diferentes concentrações dos antibióticos testados nos meios líquido, sólido e em placas de disco. Tanto *C. violaceum* quanto *E. coli* mostram-se mais sensíveis aos antibióticos rifampicina e eritromicina quando cultivadas em meio líquido. Em meio líquido, *C. violaceum*

mostrou-se sensível à rifampicina para concentrações maiores que 50 µg/mL (Tabela 5.4), porém, apresentou resistência à rifampicina nas concentrações de 50 a 200 µg/mL, quando cultivada em meio sólido. Já *E. coli* apresentou sensibilidade a concentrações maiores de 20 µg/mL de rifampicina em meio sólido, o que mostra que *C. violaceum* é mais resistente a este antibiótico que *E. coli*. *C. violaceum* apresentou resistência também ao antibiótico vancomicina em concentrações de 50 a 150 µg/mL, enquanto que *E. coli* mostrou-se sensível a este antibiótico em concentrações maiores que 75 µg/mL (Tabela 5.4). *C. violaceum* mostrou-se sensível a gentamicina em concentrações maiores que 10 µg/mL e a Cotrimoxazol em concentrações maiores que 25 µg/mL, já *E. coli* apresentou resistência a estes antibióticos nas mesmas concentrações (Tabela 5.2). *C. violaceum* não mostrou-se resistente aos antibióticos canamicina, espreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e ao ácido nalidíxico nas concentrações testadas (Tabelas 5.2 e 5.4).

Interessantemente, *C. violaceum* (linhagem ATCC 12472) apresenta um gene resistente a brometo de etídio (*emrE*), motivo que levou tal composto a ser testado como agente de seleção das colônias. O antibiótico canamicina também foi escolhido, uma vez que o transposon consta de um fragmento de DNA que confere resistência a este antibiótico. Quando ocorre a transferência do transposon por conjugação, as colônias de *E. coli* (doadoras) morrem na presença de Km. Porém, testes realizados apenas com Km como seletor, não garantiam uma boa eficiência na seleção das colônias, uma vez que muitas colônias de *E. coli* eram sobreviventes, ou seja, colônias que não foram conjugadas e permaneceram com o transposon. A concentração ideal de seletores para obter as mutantes de *C. violaceum* foi de 50 mg/mL de Km e 30 mg/mL de brometo de etídio. Diante destes seletores, colônias isoladas pigmentadas e despigmentadas foram obtidas. As mutantes despigmentadas foram coletadas e todas eram luminescentes na câmara de luminometria, caracterizando a inserção do mini-Tn5 *luxCDABE* no cromossomo de *C. violaceum*.

## 5.7 Característica das Mutantes de *C. violaceum*

Como descrito previamente (item 4.3.2, Capítulo 4), foram construídas dez mutantes através da inserção aleatória de mini-Tn5 *luxCDABE* no genoma de *C. violaceum* (linhagem ATCC 12472). Destas, 5 foram selecionadas (CVm1, CVm3, CVmA5, CVmA6,

CVmB8) por apresentarem pouca ou quase nenhuma pigmentação violeta, quando comparadas com a linhagem selvagem. Esta seleção foi feita a partir da facilidade em selecionar as colônias mutadas (colônias incolores) e também pelo interesse em se descobrir novos genes (ou regiões de regulação) que reprimem a produção de violaceína quando não são expressos, mesmo quando *C. violaceum* é cultivada a 30°C e com disponibilidade de oxigênio. A Figura 5.13 mostra a linhagem selvagem comparada com duas das mutantes estudadas (CVmA5 e CVmA6) quando cultivadas em meio líquido LB. As Figuras 5.13 e 5.14 mostram a pigmentação característica da mutante CVm1 e da linhagem selvagem quando cultivadas em meio sólido LB agar, durante um e dois dias de cultivo.

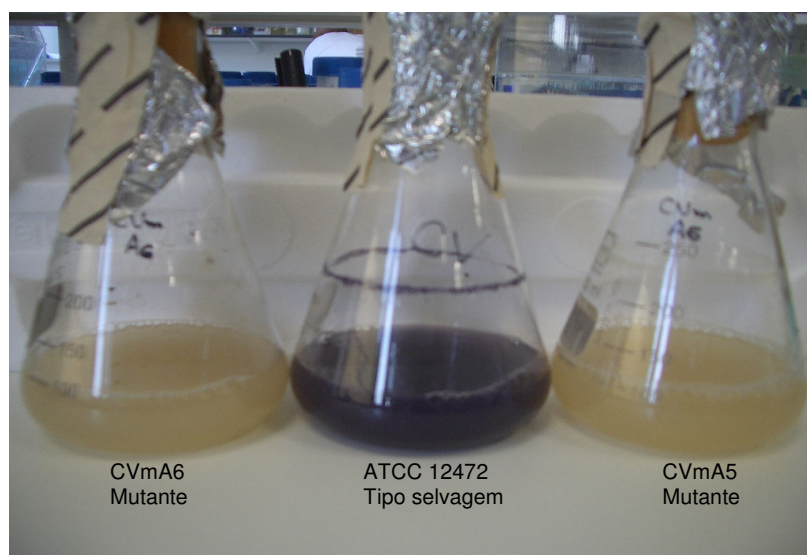


Figura 5.13. Fenótipo das mutantes de *C. violaceum*: repressão da produção de violaceína. As linhagens foram submetidas às mesmas condições de cultivo (temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e tempo de cultivo de 16 horas).

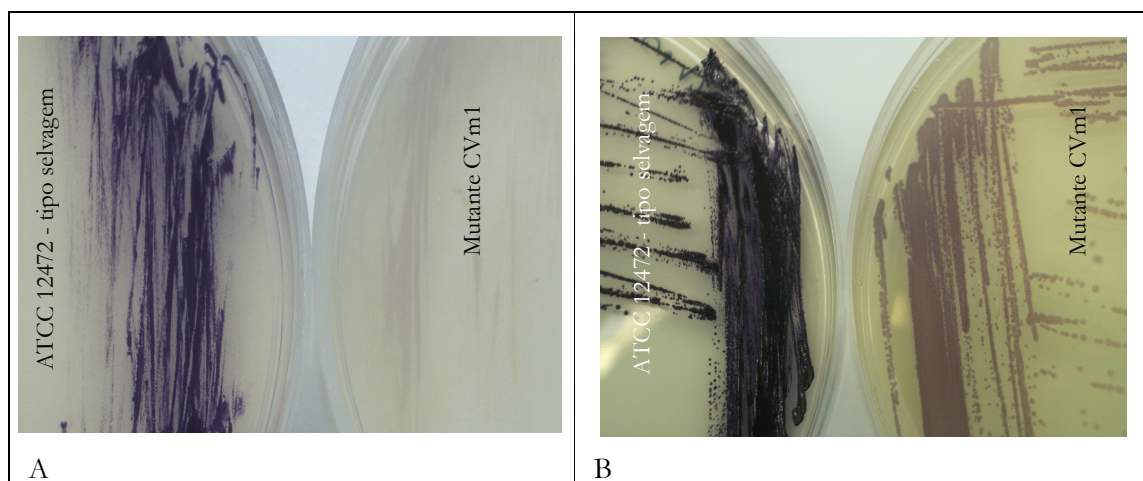


Figura 5.14. Resultado fenotípico da mutação de *C. violaceum* – repressão de violaceína. Meio sólido LB Agar, 30°C. (A) 1º dia de cultivo; (B) 2º dia de cultivo.

Como pode ser visto nas Figuras 5.13 e 5.14, as mutações por inserção transposicional causaram uma repressão da produção do pigmento característico em *C. violaceum*. É neste extrato que a violaceína é o composto majoritário e, portanto, o mini-Tn5 foi inserido em uma região regulatória da produção de violaceína e derivados da mesma via biossintética. Para um tempo maior de cultivo mesmo sob condições favoráveis para a produção de pigmento (30°C e sob oxigenação), a produção de violaceína nas mutantes vai sendo aumentada, mas nunca chega à superprodução como é característica da linhagem selvagem ATCC 12472. Este fato ocorre porque os genes regulatórios estão sendo expressos em nível basal por causa da inserção do transposon na região de regulação, refletindo na diminuição da produção do pigmento violeta.

Observou-se que durante a estocagem de rotina das placas de *C. violaceum* (temperatura ambiente de aproximadamente 25°C), as linhagens que produziam menos pigmento, tanto as mutantes como a linhagem selvagem ATCC 31532, morriam dentro de um período menor do que a linhagem selvagem ATCC 12472 (repicada em placa a cada 20 dias). Novas placas eram preparadas a cada 7 dias para garantir a sobrevivência das linhagens pouco pigmentadas. A mutante CV026, que não produz nenhum pigmento, parece ser a linhagem mais sensível tendo que ser repicada a cada 3 dias no máximo (em placa). Esta sensibilidade parece estar relacionada com a produção de violaceína, que deve conferir vantagens de sobrevivência à espécie, mas esta relação deve ser melhor explorada.

## 5.8 Identificação de AHL: ATCC 12472 Produz Três Moléculas Indutoras

A identificação de moléculas AHL (N-Acil Homoserina Lactonas) foi feita através de bioensaio com as linhagens CV026, CV017 (*C. violaceum*), pSB401 e pSB1075 (*E. coli*). A Figura 5.15 mostra um ensaio prévio para análise de inibição de AHL de cadeia longa em *C. violaceum*. Para isto foram utilizados dois biossensores, uma mutante (CV017) e a linhagem selvagem de *C. violaceum* (ATCC 12472).

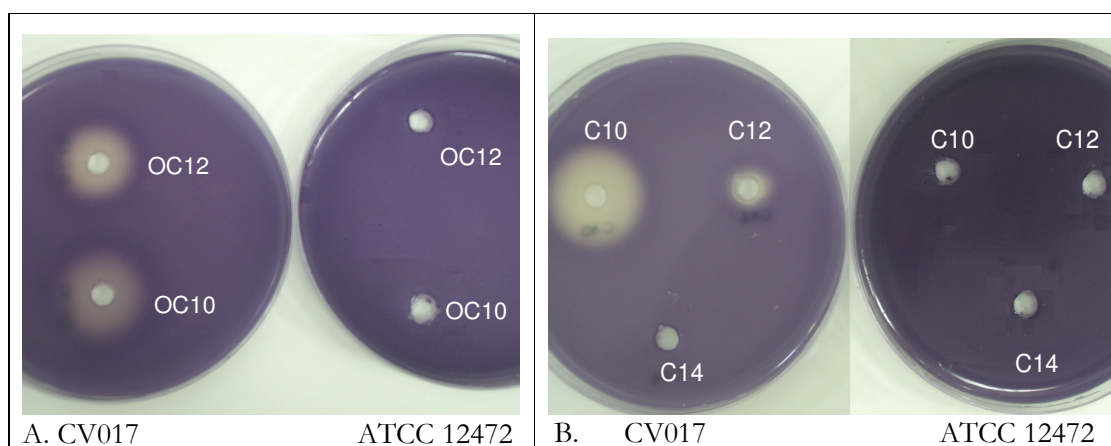


Figura 5.15. Inibição de violaceína em CV017 (mutante de ATCC 31532) por AHL de cadeia longa. (A) AHL de cadeia longa com o grupo de substituição oxo. (B) AHL de cadeia longa sem o grupo de substituição oxo. Nas placas da direita, CV017 foi usado como biossensor. Nas placas da esquerda o biossensor utilizado foi ATCC 12472 (tipo selvagem).

CV017 é uma mutante de *C. violaceum* da linhagem ATCC 31532 (McClellan *et al.*, 1997) e produz mais violaceína do que o tipo selvagem. A mutação também foi feita por inserção de mini-Tn5 em uma região de um suposto repressor (Taylor, 1997), fazendo com este gene não reprima mais a produção de violaceína, que é produzida em menor concentração na linhagem selvagem (ATCC 31532). Uma tipo de molécula AHL de cadeia curta (HHL) foi detectado na linhagem ATCC 31532 e este é o indutor responsável pela interação com a proteína regulatória CviR, responsáveis pelo *quorum sensing* em *C. violaceum*. Isto sugere a inibição de violaceína em CV017 por uma molécula AHL de cadeia longa, indicando que o indutor deve ser específico ao sítio ativo da proteína CviR, causando dimerização e ativando o operon *vioABCD* pelo mecanismo *quorum sensing*.

O resultado deste ensaio nos revela que há inibição de violaceína em CV017 quando AHL de cadeia longa está presente no meio, mas o mesmo não ocorre com a linhagem selvagem de *C. violaceum* (ATCC 12472 – linhagem seqüenciada), o que nos surpreendeu em um primeiro momento, pois acreditava-se que a mesma resposta fosse reproduzida para ATCC 12472, por se tratar do mesmo microrganismo. CV017 respondeu positivamente à produção de violaceína para AHL de 14 carbonos (tDHL), porém isto se deve ao fato de que a concentração adicionada de tDHL foi muito baixa, não sendo suficiente para competir com a molécula HHL presente naturalmente no meio. A partir deste pré-ensaio, moléculas AHL presentes na linhagem ATCC 12472 e em suas mutantes foram identificadas através do Bioensaio em Cromatografia de Camada Delgada e os resultados são mostrados a seguir (Figuras 5.16-5.21).

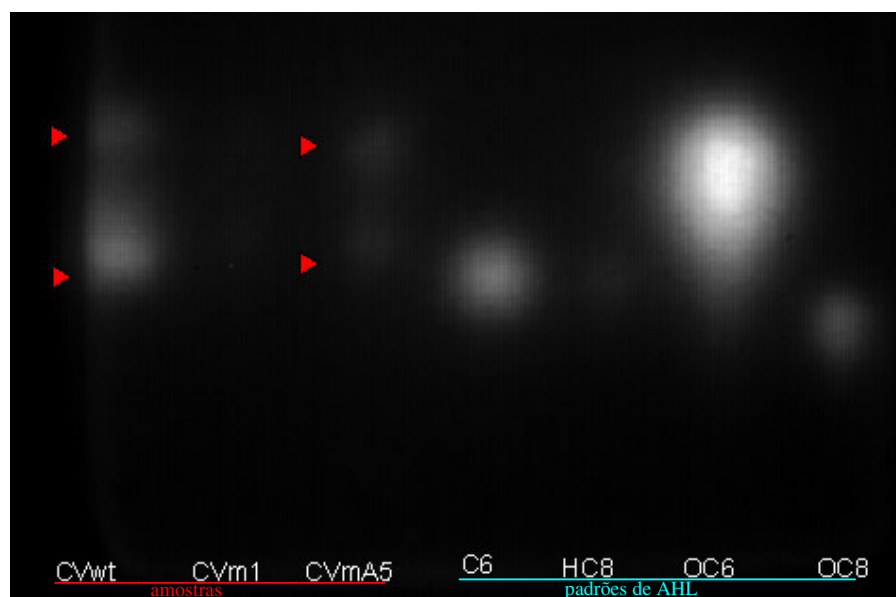


Figura 5.16. Identificação de AHL de cadeia curta a partir da extração do sobrenadante das culturas de *C. violaceum* e suas mutantes. CVwt: tipo selvagem-ATCC 12472; CVm1, CVm3, e CVmA5: mutantes de ATCC 12472. Padrões de AHL: C6: HHL; OC6: OHHL; OC8: OOHL; HC8: HOHL. Biossensor: pSB401.

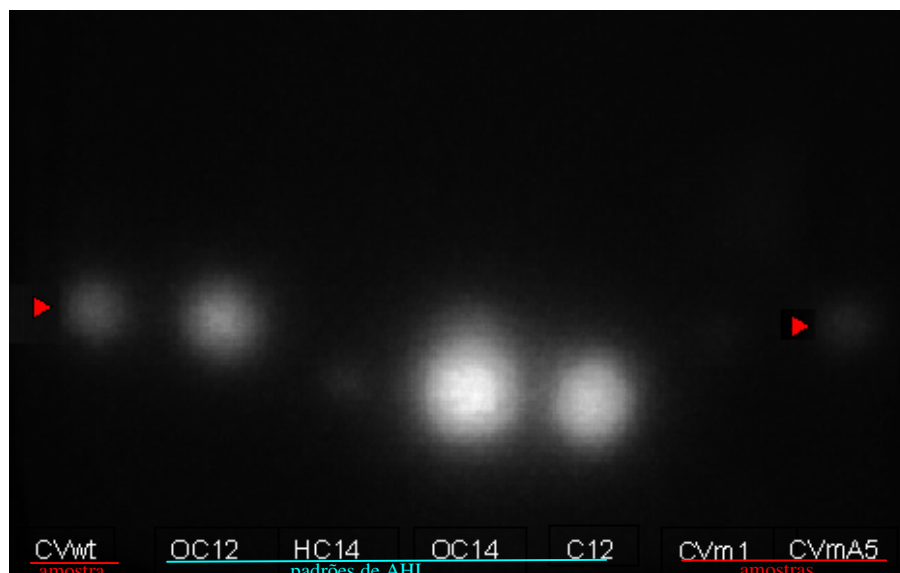


Figura 5.17. Identificação de AHL de cadeia longa a partir da extração do sobrenadante das culturas de *C. violaceum* e suas mutantes. CVwt: tipo selvagem ATCC 12472; CVm1, CVm3, e CVmA5: mutantes de ATCC 12472. Padrões: C12: dDHL ; OC12: OdDHL ; OC14: OtDHL; HC14: HtDHL. Biossensor: pSB1075.

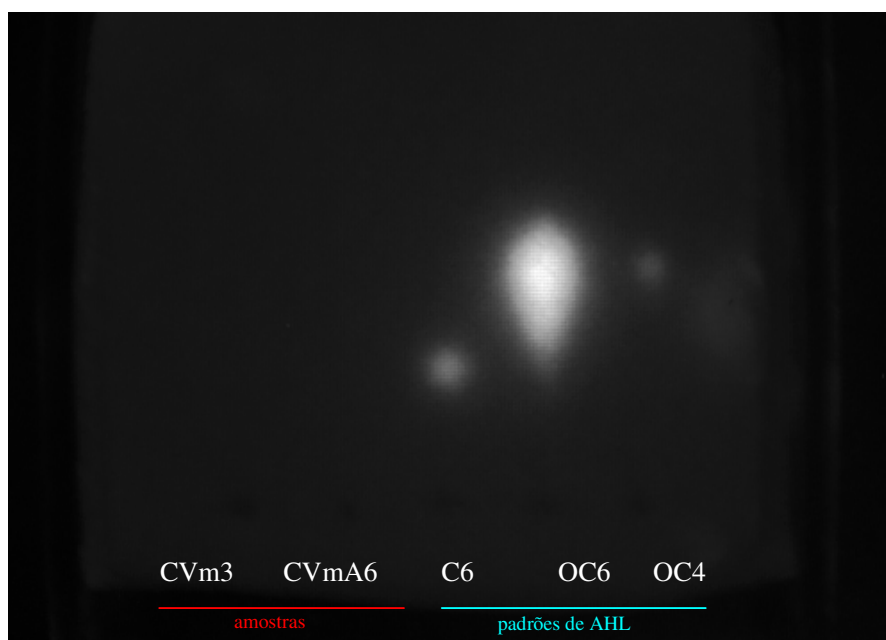


Figura 5.18. Identificação de AHL de cadeia curta a partir da extração do sobrenadante das culturas mutantes de *C. violaceum* (CVm3 e CVmA6). Padrões: C6: HHL; OC6: OHHL; OC4: OBHL. Biossensor: pSB401.



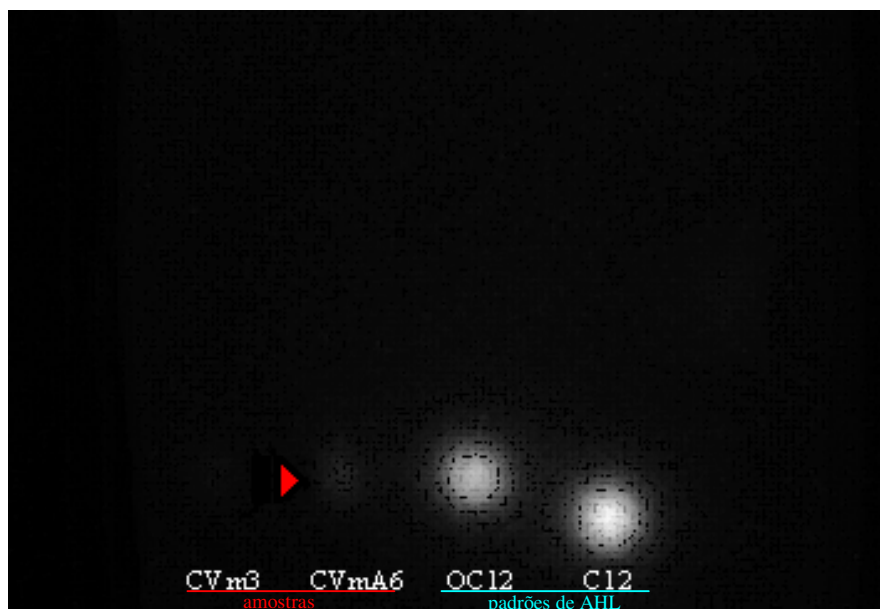


Figura 5.19. Identificação de AHL de cadeia longa a partir da extração do sobrenadante das culturas mutantes de *C. violaceum* (CVm3 e CVmA6). Padrões: OC12: OdDHL; C12: dDHL. Biossensor: pSB1075.

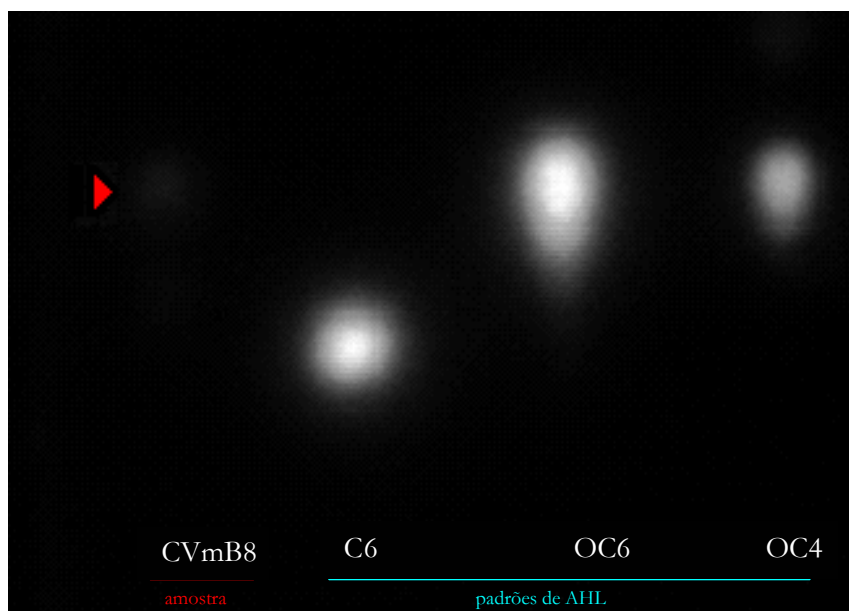


Figura 5.20. Identificação de AHL de cadeia curta a partir da extração do sobrenadante da cultura de CVmB8 (mutante de *C. violaceum*). Padrões: C6: HHL; OC6: OHHL; OC4: OBHL. Biossensor: pSB401.

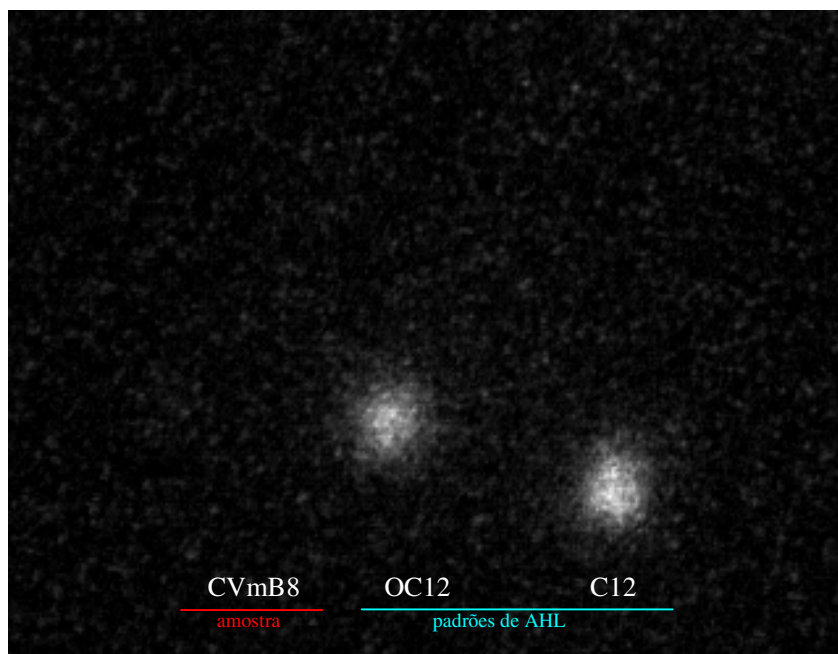


Figura 5.21. Identificação de AHL de cadeia longa a partir da extração do sobrenadante da cultura de CVmB8 (mutante de *C. violaceum*).

As Figuras 5.16-5.21 mostram as moléculas de AHL identificadas para a linhagem selvagem de *C. violaceum* (ATCC 12472) e para suas mutantes utilizando-se os biossensores pSB401, que torna-se luminescente quando em presença de AHL de cadeia curta, e pSB1075, que fica luminescente na presença de AHL de cadeia longa. A linhagem selvagem apresenta dois tipos de AHL de cadeia curta, HHL (N-hexanoil-L-homoserina lactona) e OHHL (oxo-hexanoil-L-homoserina lactona), e também uma molécula de cadeia longa, OddHL (oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona). Até o presente estudo, apenas um tipo de molécula indutora havia sido identificado em *C. violaceum* (linhagem ATCC 31532), a molécula HHL (McClellan *et al.*, 1997, Taylor, 1997). A partir destes resultados sugere-se que o mecanismo de sinalização *quorum sensing* seja diferente para as duas linhagens selvagens de *C. violaceum* e que o circuito de regulação *quorum sensing* em ATCC 12472 deve ser mais complexo, envolvendo não uma, mas três diferentes indutores de sinalização. Talvez esta seja a razão das duas linhagens selvagens apresentarem diferenças fenotípicas quanto à produção de violaceína sob as mesmas condições de cultivo, como pode ser visto na Figura 5.22.

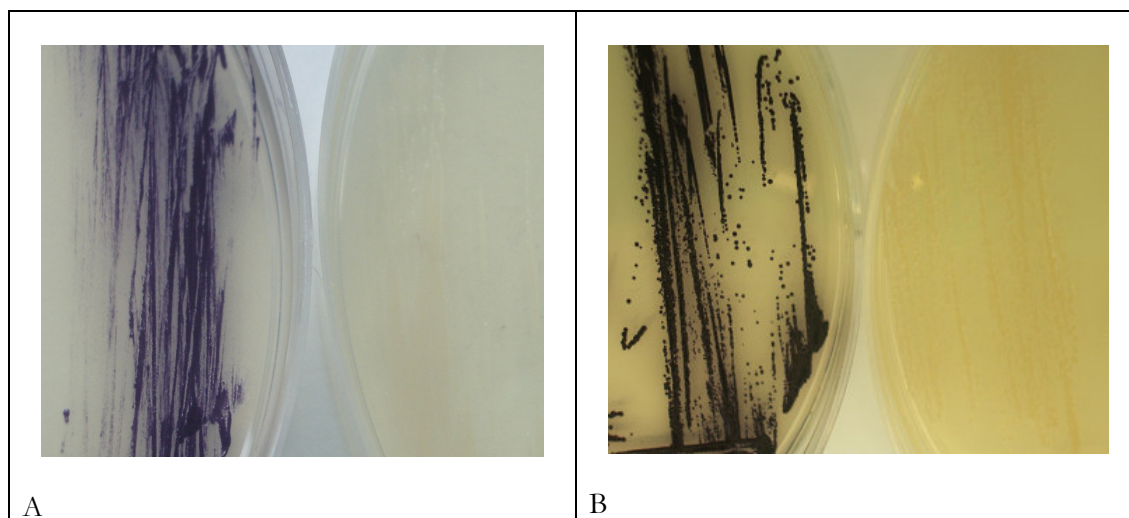


Figura 5.22. Diferença fenotípica entre as linhagens selvagens de *C. violaceum* ATCC 12472 (placa a esquerda) e ATCC 31532 (placa a direita). (A) 1º dia de cultivo; (B) 2º dia de cultivo ( $T = 30^{\circ}\text{C}$ ).

A produção de violaceína é dependente de genes de regulação, tais como os responsáveis pela sinalização *quorum sensing*, que estão diretamente relacionados à presença de moléculas indutoras (AHL) no meio intercelular. Uma vez que os tipos de moléculas AHL sejam diferentes nas duas linhagens (HHL para ATCC 31532; HHL, OHHL e OdHL para ATCC 12472), é provável que o mecanismo *quorum sensing* seja diferente. Isto reflete em uma forma de regulação particular quanto ao controle da expressão do operon *vioABCD* e talvez também de outros genes regulados por *quorum sensing* nas linhagens de *C. violaceum*.

Percebe-se também que nem todas as mutantes de ATCC 12472 apresentam as moléculas indutoras como a selvagem. A única mutante que apresenta as três moléculas AHL em comum com a linhagem selvagem é CVmA5. As mutantes CVm1 e CVm3 não apresentam nenhum tipo de AHL e apesar do método utilizado ser bastante sensível, é possível que nenhuma molécula AHL seja produzida ou que a concentração de AHL presente seja tão baixa que não seja detectável pelo biossensor. A mutante CVmA6 apresentou apenas a molécula AHL de cadeia longa (OdDHL) e CVmB8 apresentou apenas um tipo de molécula de cadeia curta (OHHL). Esta diferença de resposta quanto à presença de AHL no meio de cultura das mutantes está relacionada às diferentes posições das inserções do transposon no genoma de *C. violaceum*. Tais inserções provocaram diferentes mutações, mas com uma mesma característica fenotípica: a repressão da produção do pigmento violeta.

Na Tabela 5.5 são apresentadas as moléculas AHL identificadas para cada linhagem de *C. violaceum* estudada.

Tabela 5.5. Produção de diferentes moléculas AHL pelas linhagens de *C. violaceum*.

Linhagem	Tipo de moléculas AHL encontradas em ATCC 12472 e em suas mutantes		
	C6 (HHL)	OC6 (OHHL)	OC12 (OdDHL)
<b><i>C. violaceum</i> do tipo selvagem</b>			
ATCC 12472 (neste estudo)	+	+	+
ATCC 31532 (Taylor, 1997)	+	-	-
<b>Mutantes de <i>C. violaceum</i></b>			
CV026 (Winson <i>et al.</i> , 1994)	-	-	-
CV017 (McClean <i>et al.</i> , 1997)	+	-	-
CVm1 (neste estudo)	-	-	-
CVm3 (neste estudo)	-	-	-
CVmA5 (neste estudo)	+	+	+
CVmA6 (neste estudo)	-	-	+
CVmB8 (neste estudo)	-	+	-

(+) produção de AHL; (-) não produção de AHL. C6: N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL); OC6: N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL); OC12: N-(oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL).

Como apresentado no Capítulo 3 (item 3.3.2), a enzima responsável pela síntese de AHL é da família LuxI e pertence à classe das homoserina lactona sintetases. Acredita-se que os aminoácidos conservados na metade da região C-terminal sejam os responsáveis pela seleção do grupo acil por ACP (proteína carregadora do grupo acil) (Hanzelka *et al.*, 1997). Muitas espécies de bactérias são capazes de produzir mais de um tipo de uma molécula AHL e tem sido reportado que certos homólogos podem utilizar ACPs carregadas diferentemente para produzir as moléculas indutoras com diferentes comprimentos de cadeia (Schaefer *et al.*, 1996; Parsek *et al.*, 1997). É possível que na linhagem de *C. violaceum* ATCC 12472, a proteína ACP seja capaz de carregar três tipos de grupo acil (hexanoil, oxohexanoil e oxododecanoil), e em presença de S-adenosil metionina, a enzima CviI

sintetiza não uma, mas três moléculas AHL, como identificado na linhagem selvagem (Tabela 5.5).

Como as proteínas ACP são intermediários comuns do metabolismo de ácido graxo, é provável que ACPs carregadas com cadeias acila de diferentes comprimentos coexistam nas células. A Tabela 5.6 mostra os 22 tipos de proteínas ACP encontradas no genoma de *C. violaceum* (ATCC 12472).

Tabela 5.6. Proteínas carregadoras do grupo acil (ACP) encontradas como o produto da ORF em *C. violaceum*.

Gene	Produto da ORF
CV0805	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase III
CV1096	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase III
CV1541	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase II
CV1546	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] redutase
CV1583	enoil-[proteína carregadora do grupo acil] redutase (NADH)
CV2016	[proteína carregadora do grupo acil] fosfodiesterase
CV2072	holo-[proteína carregadora do grupo acil] sintase
CV2207	(3R)-hidroxymisristol proteína carregadora do grupo acil desidratase
CV2208	acil-[proteína carregadora do grupo acil]-UDP-Nacetilglucosamina O-aciltransferase
CV2446	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase III
CV2615	proteína carregadora do grupo acil
CV3412	3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase II
CV3413	proteína carregadora do grupo acil
CV3414	3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] redutase
CV3415	malonil CoA [proteína carregadora do grupo acil] transacilase
CV3416	3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase II
CV3576	3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] redutase
CV3743	provável enoil-[proteína carregadora do grupo acil] redutase (NADH)
CV3947	probable 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] redutase
CV3948	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase II
CV3949	provável 3-oxoacil-[proteína carregadora do grupo acil] sintase II
CV3950	provável (3R)-hidroximiristol-[proteína carregadora do grupo acil] desidratase

Fonte: <http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>

A Tabela 5.6 apresenta diferentes genes responsáveis pela expressão de proteínas carregadoras do grupo acil. Doze dos produtos dos genes caracterizam a proteína

carregadora do grupo oxoacil, como caracterizado em duas dos três tipos de moléculas AHL, identificadas em *C. violaceum* (ATCC 12472).

Uma vez que a linhagem ATCC 31532 produz apenas um tipo de AHL e que a linhagem ATCC 12472 produz três tipos de AHL, fez o alinhamento entre as seqüências de *cvlI* das duas linhagens utilizando-se o programa ClustalW para analisarmos as diferenças entre as duas seqüências. O alinhamento foi feito entre as seqüências de nucleotídeos e também de aminoácidos de CviI.

CV12472-cviI	ATGAAAGATTTTTTCCGCTGCAACAAGGTGGACTGGTACTGGAGTGGGTCAATACTGAA	60
CV31532-cviI	-----GAAGACGAA	9
	*        ***	
CV12472-cviI	ACTAAGCTGCGACAGTTGTGGGCGTTCCGTCACAGAATCTTCCGGGAACAGCTGCAGTGG	120
CV31532-cviI	AGCACGATGCTCGACCTGCTGGCGTTCAGACACAAGATTTCCGGGAGAATCTGCGTTGG	69
	* *	
CV12472-cviI	GTGCCCTTATGCGAGGACGGTTTCGATCGGGACGCATACGATGATTTTTCCGACAACCTTG	180
CV31532-cviI	CTGCCGGTGTGCGCAATGGCTGGATAGGGATGAATACGACGCCATTTCCGATAATCTG	129
	**** *	
CV12472-cviI	GTATTGTGCCGGGATGGCGAGGTGCTCGGCGGATACGGTTGACTACCGGAGAGCATCCT	240
CV31532-cviI	GCGATCTGCCTGGATGGCCAGGTGGTGGGGTCGGTCAGGTTTACTCCGGGAACCGAGCGT	189
	* *	
CV12472-cviI	TTCATGTTGGAGGAAGAGTTCTCGCGCTTGCTGGCGCCGGGCGAGCGGATAGGCAAGGGG	300
CV31532-cviI	TATATGTTGAAAAGGACTTTCCAGGCTATTGGTGGCGGACGAGATTTGTACAAAGGG	249
	* *	
CV12472-cviI	GCGGAATATTCGGAAATCACCCGACTGGCCGTGGACAGGGAAGCGCTGGGCGCGCGCGAG	360
CV31532-cviI	GGGGCAAGCGCGGAGATCTCGCGTTTCGCGGTGGACACGGAACGCTGGGCAGGAACTG	309
	* *	
CV12472-cviI	TCCATCATGGCGCCAGATTGCTCTATCTGGGCGCGTGGCTGTGGTCCCAGGTTTCAGGGC	420
CV31532-cviI	ACCGCTTCCGCTTCCCGATTGCTGTATCTCAGCTTGCGCAATGGGCGAGTGGAACGAG	369
	**        *	
CV12472-cviI	GTGCGCTGGATGTATTTTCGTCGTGGAGCCGGTGTTTTACCGCGCCTGGTGATGATGGGC	480
CV31532-cviI	ATCCGCTGGATGTATTTTCGTGGTAGAGCCGCTATGTACCGCCGGCTGGTCGCGCTTGGT	429
	* *	
CV12472-cviI	TTCCCCATCGTGCCGGTAGGCATACCCCGCCCACTGGATGGCGGGGTGATGTCGATGACG	540
CV31532-cviI	TTCCCCATCCGGCCGTGGGGGTCCCGCGACCGCTTGACGGCGGAGTGCTGTCCATGGCC	489
	***** *	
CV12472-cviI	GGCTTGCTGGACTGGAGGCAGGCGAAAACCGAGCTTATCCGTTCACTAACTCGCGGGGTG	600
CV31532-cviI	GGCTATTTGCACTGGGGCCAGATCCGCGCGAGGTCATTCGTTCTGCTACGGTCGAGGGTG	549
	**** *	
CV12472-cviI	TCATCGCCAAGTGCATGCCAAGCACTATGGCATGAGTACGATTATTCGATTGA	654
CV31532-cviI	GCATTGCCAGATGCATGCCAGACAATGGCGTGAGTACGATTATTCGATTGA	603
	** *	

Figura 5.23. Alinhamento entre os nucleotídeos de *cvlI* de ATCC 31572 e de ATCC 12472. (\*) Nucleotídeos idênticos; Identidade: 72%. CLUSTAL W (1.82).

CviI-31532	-----MLDLLAFHKKIFRENLRWLPVCGNGLDRDEYDAISDNL	38
CviI-12472	MKDFFPLQQGGLVLEWVNTETKLRQLWAFRRHIFREQLQWVPLCEDGFDRLDAYDDFSDNL	60
	: : * * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *	
CviI-31532	AICLDGQVVGSVRFTPTGTERYMLEKDFSRLLPDEILYKGGASAEISRFAVDTEITLGRKL	98
CviI-12472	VLCDRGVVGAIRLTTGHPFMLEEFSSRLAPGERIGKGAEYSEITRLAVDREALGARE	120
	. : * * : * * * : * : * . : * * : * * * : * * : * * : * * * : * * :	
CviI-31532	TASASRLLYLSLWQWAEWNEIRWMYFVVEPSMYRRLVALGFPIRPVGVPRPLDGGVLSMA	158
CviI-12472	SIMAA RL LYLGAWLWSQVQGV R WMYFVVEPVFYRRLVMMGFPIVPVGIPRPLDGGVMSMT	180
	: * : * * * . * : : : : * * * * * : * * * : * * * : * * * : * * :	
CviI-31532	GYFDWGQIRGEVIRSLRSRVALPDACPAQWREYDYSH	195
CviI-12472	GLLDWRQAKTELIRSLTRGVSSPSACQALWHEYDYSH	217
	* : * * : * : * * * : * : * * : * : * * : * * * * : * * * *	

Figura 5.24. Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos de CviI de ATCC 31572 e de ATCC 12472. (\*) aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos conservados; (.) aminoácidos semi-conservados. Programa ClustalW (1.82).

Algumas diferenças são observadas entre os genes *cviI* das duas linhagens de *C. violaceum*. O gene *cviI* de ATCC 12472 apresenta 48 bp a mais que o gene *cviI* de ATCC 31532. A identidade entre as seqüências de nucleotídeos é de 72%. Nota-se que os primeiros 51 nucleotídeos de *cviI* da linhagem ATCC 12472 não apresentam similaridade com *cviI* da linhagem ATCC 31532, sendo esta a diferença mais marcante entre as duas seqüências. Os domínios que caracterizam a funcionalidade da enzima CviI para ambas as linhagens é mostrado na Figura 5.25.

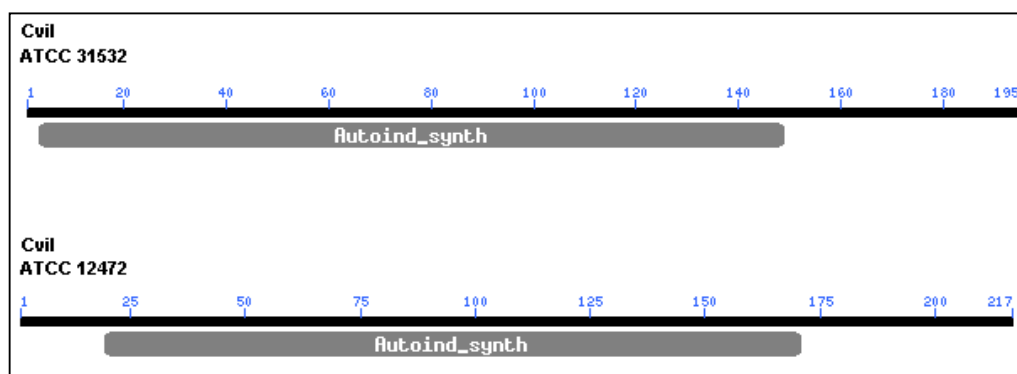


Figura 5.25. Domínio da enzima CviI para as linhagens ATCC 12472 e ATCC 31532, de acordo com o resultado Blast-PDB. Os números em azul representam os resíduos de aminoácidos.

O domínio funcional da enzima CviI da linhagem ATCC 31532 está entre os resíduos 3 e 149 e o domínio de CviI linhagem ATCC 12472 está entre os resíduos 19 e 171. Embora 72% de identidade seja considerado uma homologia com alta similaridade, esperava-se uma maior identidade para CviI das linhagens de *C. violaceum*, considerando que são microrganismos da mesma espécie. Acredita-se que a diferença de identidade de 28%

entre as seqüências de CviI caracterize a funcionalidade da enzima em sintetizar diferentes AHLs nas duas linhagens de *C. violaceum*.

Para verificar os resíduos conservados entre os homólogos de CviI que sintetizam HHL, OHHL e OdDHL fêz-se o alinhamento entre alguns homólogos da família LuxI (Figuras 5.26-5.28).

ExpI	MLEIFDVNHTLLS-----ETKSEELFTLRKETFKDRLNWAVQCTD---GMEFDQYDNNN	51
YenI	MLKLFNVNFNNMP-----ERKLEIFSLREITFKDRLDWKVTCTD---GKESDQYDDEN	51
CviI-31532	-----MLDLLAFRHKIFRENLRWLPVCGN---GLDRDEYDAIS	35
CviI-12472	MKDFFPQQGGVLVLEWVNTETKLRQLWAFRHRIFREQLQWVPLCED---GFDRLDAYDDFS	57
PhzI	-MHMEHTLNGMS-----DELKMLGRFRHEQFVEKLGWRLPAHPSQPGCEWDQYDTEH	53
	: : * . * : * * . * : * *	
ExpI	TTYLFGIKDNT-VICSLRFIETKYPNMITGTFPPYFK--EINIPDGNYLESSRFFVDKSR	108
YenI	TNYILGTIDDT-IVCSVRFIDMKYPTMITGPFAPYFS--DVSLPIDGFISSRFFVEKAL	108
CviI-31532	DNLAI-CLDGQ-VVGSVRFPTGTERYMLEKDFSRLLVPDEILYKGGASAEISRFAVDTE	93
CviI-12472	DNLVL-CRDGE-VVGAIRLTTGEHPFMLEEFSSRLAPGERIGKGAEYSEITRLAVDREA	115
PhzI	ARYLLAFNEDCAIVGCARLIPTTFPNLLEGVFGHTCAG--APPKHAIWEMTRFTTREP-	110
	: : . : . * : : * * : * :	
ExpI	AKDILGNEYPISSMLFLSMINYSRDKGYDGIYITIVSHPMLTILKRSGWGISVVEQGLSEK	168
YenI	ARDMVGNNSSLTILFLAMVNYARDRGHKGILTVVSRGMFILLKRSGWNITVLNQGESEK	168
CviI-31532	LGRKLT--ASASRLLYLSLWQWAEWNEIRWMYFVVEPSMYRRLVALGFPIRPVGVPRPLD	151
CviI-12472	LGARES--IMAAARLLYLGAWLWSQVQGVWRMYFVVEPVFYRRLVMMGFPIRPVGVPRPLD	173
PhzI	-----QLAMPLFWRSKLTASLAGADAIVGIVNSTMERYYKINGVHYERLGPVTVHQ	161
	: * : : : * : *	
expI	EEKVYLVFLPVDDENQEALARRINRSGTFMSNELKQWPLRLPAAIAQA	216
YenI	NEVIYLLHLGIDNDSQQQLINKILRVHQVEPKTLETWPIIVPGI IK--	214
CviI-31532	GGVLSMAGYFDWGQIRGEVIRSLRSRVALPDACPAQWREYDYSH----	195
CviI-12472	GGVMSMTGLLDWRQAKTELIRSLTRGVSSPSACQALWHEYDYSH----	217
PhzI	NEKILAIKLSAHRHHRGAAAPS AFMSDTLLKEIA-----	196
	: : :	

Figura 5.26. Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos de alguns homólogos de LuxI que sintetizam HHL. Proteína e respectivo microrganismo: ExpI (*Erwinia chrysantheme*); YenI (*Yersina enterocolítica*); PhzI (*Pseudomonas chlorophins*); CviI (*Chromobacterium violaceum* – ATCC 31532); CviI (*Chromobacterium violaceum*-ATCC 12472). (\*) aminoácidos idênticos (R, F, L, W, G, D, Y, E e V); (:) aminoácidos conservados; (.) aminoácidos semi-conservados. Programa ClustalW (1.82).



```

CviI-12472      MKDFFPLQQGGLVLEWVNTETKLRQLWAFRHRIRFREQLQWVPLCEDGFDRDAYDDFSNLL 60
LasI            -----MIVQIGRREEFD--KKLLGEMHKLRAQVFKERKGWDVSVIDEMEIDGYDALSPYY 53
                  : * * * * : : * : : * : : : * * * : *

CviI-12472      VLCRDG---EVVGAIRLTGTGHEPFMLEEFSRLAPGERIGKGAEYSEITRLAVDREAL 116
LasI            MLIQEDTPEAQVFGCWRILDTTGPYMLKNTFPPELLH-GKEAPCSPHIWELSRFAINSQK 112
                  * : : : * * * * : * : : : * : : : * : : : *

CviI-12472      GARESIMAAARLLYLGAWLWSQVQGVWRMYFVVEPVFYRLVMMGFPIVPVGIIPRLDGGV 176
LasI            GS----- 114
                  * :

CviI-12472      MSMTGLLDWRQAKTELIRSLTRGVSSPSACQALWHEYDYSH 217
LasI            -----LGFSDCTLEAMRALAR-YSLQNDIQTL----- 140
                  * : : : * * : : * * * * *

```

Na Figura 5.26 é apresentado o resultado referente ao alinhamento entre os homólogos de CviI que sintetizam a molécula HHL. As seqüências correspondem às proteínas dos seguintes microrganismos que sintetizam HHL: ExpI (*Erwinia chrysanthemi*); YenI (*Yersina enterocolitica*); PhzI (*Pseudomonas chlorophins*); CviI (*Chromobacterium violaceum*,

ATCC 31532); CviI (*Chromobacterium violaceum*, ATCC 12472). Entre tais homólogos, nove resíduos são idênticos, sendo eles: Argina (R), fenilalanina (F), leucina (L), triptofano (W), glicina (G), ácido aspártico (D), tirosina (Y), ácido glutâmico (E) e valina (V).

A Figura 5.27 mostra os resíduos conservados para homólogos de CviI que sintetizam OHHL. As seqüências de proteínas são referentes aos seguintes microorganismos: *Erwinia chrysantheme* (ExpI); *Yersinia enterocolítica* (YenI); *Vibrio fischeri* (LuxI); *Chromobacterium violaceum* - ATCC 12472 (CviI). Para estes homólogos, dez resíduos de aminoácidos são idênticos. Oito são comuns entre os homólogos que sintetizam HHL (Figura 5.19), apresentando ainda mais dois resíduos que são altamente conservados: a isoleucina (I) e a metionina (M) como idênticos entre as seqüências.

A Figura 5.28 mostra os resíduos conservados na proteína CviI e em seu homólogo, LasI, responsável pela síntese de OdDHL em *Pseudomonas aeruginosa*. Quatorze resíduos de aminoácidos são idênticos. Resíduos que não são comuns entre os homólogos que sintetizam HHL e OHHL são glutamina(Q), prolina (P), serina (S) e alanina (A), e estes resíduos podem ser responsáveis pela capacidade de CviI em sintetizar homoserina lactona de cadeia longa, OdDHL.

Como no genoma de ATCC 12472 apenas um homólogo da família LuxI foi encontrado (CviI), acredita-se que a diferença entre as duas linhagens de *C. violaceum*, (ATCC12472 e ATCC 31532) em produzir diferentes moléculas AHL se deve ao fato de que a enzima CviI de ATCC 12471 não seja específica, aceitando mais de um substrato, com diferente atividade. Outros casos têm sido reportados de microorganismos que produzem mais de uma molécula AHL. A molécula AHL pode ser sintetizada pelo produto de um gene ou mais genes homólogos de *luxI*. *Yersinia enterocolítica*, por exemplo, produz ambas HHL e OHHL, sintetizadas pelo produto do gene *yenI* (Throup *et al.*, 1995). Já *Erwinia chrysantheme*, produz pelo menos três tipos de moléculas AHL; N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL), oxohexanoil-L-homoserina lactona (OHHL), e dodecanoil-L-homoserina lactona (DHL) (Nasser *et al.*, 1998). Estes autores sugerem que o gene *expI* (homólogo da família *luxI*) seja responsável pela produção de HHL e OHHL, mas que DHL (molécula de 10 carbonos) parece ser produzida por um produto de outro gene ainda não identificado.

## 5.9 Caracterização dos Clones

Foram obtidos clones de todas as mutantes de ATCC 12472. Após a extração do DNA plasmideal, as amostras foram submetidas ao seqüenciamento de DNA na Universidade de Nottingham (laboratório de seqüenciamento do Hospital Universitário, Queens Medical Centre) para serem caracterizadas. A Tabela 5.7 resume os genes e regiões de regulação responsáveis pela biossíntese de violaceína em cada mutante.

Tabela 5.7. Regiões de regulação da biossíntese de violaceína em *C. violaceum*.

Mutantes de ATCC 12472	Atividade AHL	Resultado BLAST	
		Regiões ou genes de regulação (ORF)	Produto do gene
CVm1	HHL- OHHL- OdDHL-	1) CV4091 2) CV4092	1) Homoserina lactona sintetase; 2) Provável aldeído dehidrogenase: atuação na via do triptofano
CVm3	HHL- OHHL- OdDHL-	CV4089	Proteína hipotética
CVmA5	HHL+ OHHL+ OdDHL+	1) CV0642 2) CV0643 3) CV0644 4) CV0645	1) Proteína hipotética 2) Proteína hipotética 3) Proteína hipotética 4) Proteína hipotética conservada
CVmA6	HHL- OHHL- OdDHL+	CV0081	Provável citocromo c4: produção e conservação de energia
CVmB8	HHL- OHHL+ OdDHL-	CV4092	Provável aldeído dehidrogenase: atuação na via do triptofano

AHL+: produz AHL; AHL-: não produz AHL.

As Figuras 5.29 a 5.33 mostram a posição de inserção do transposon no genoma de *C. ATCC 12472* e foram adaptadas a partir da representação original, que pode ser

encontrada na página *website* do Projeto Genoma da *C. violaceum* (<http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>).

As figuras estão em escala e a linha central representa uma régua marcando a posição dos genes no genoma de ATCC 12472. Os genes são representados por retângulos e os que estão abaixo da linha central são transcritos na fita complementar do DNA. Estes resultados foram encontrados a partir dos dados de seqüenciamento das amostras plasmídeais extraídas dos clones e do resultado BLAST com as regiões homólogas do genoma de *C. violaceum*, indicadas em tracejado.

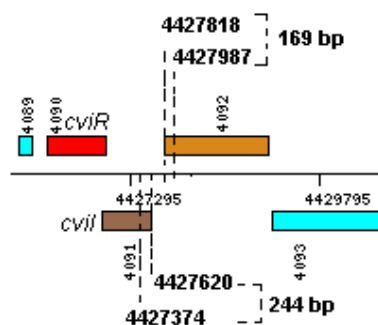


Figura 5.29. Região de inserção de mini-Tn5 *luxCDBAE* gerando a mutante CVm1.

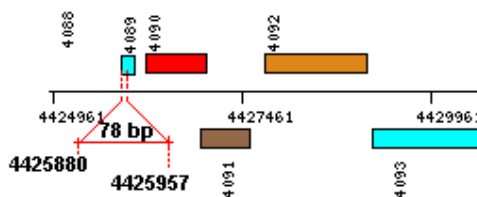


Figura 5.30. Região de inserção de mini-Tn5 *luxCDBAE* gerando a mutante CVm3.

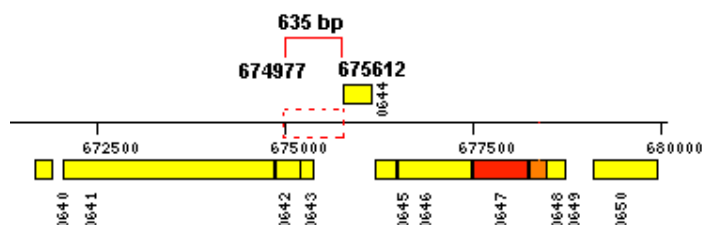


Figura 5.31. Região de inserção de mini-Tn5 *luxCDBAE* gerando a mutante CVmA5.

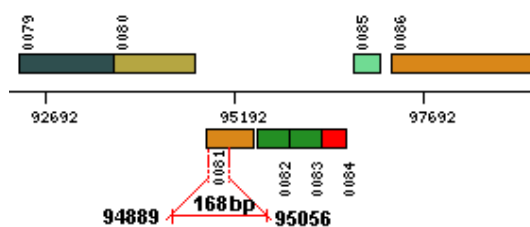


Figura 5.32. Região de inserção de mini-Tn5 gerando a mutante CVmA6.

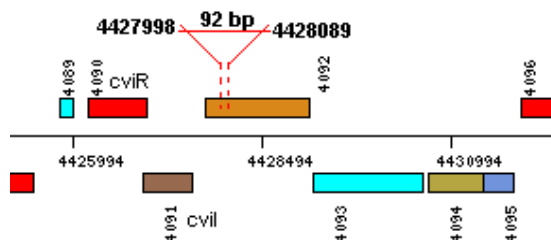


Figura 5.33. Região de inserção do mini-Tn5 gerando a mutante CVmB8.

Para a caracterização dos plasmídeos extraídos dos clones de cada mutante, iniciadores foram desenhados a partir das seqüências do gene que confere resistência à

canamicina (Km) e de *luxE*, porém com estes *primers* não foi possível obter os dados de seqüenciamento, o que foi atribuído a uma possível estrutura secundária na amostra. O alto índice de CG (cerca de 64,83% (National Brazilian Genome Project, 2003)) pode ter contribuído para este insucesso. Desta forma, optou-se por utilizar iniciadores universais (M13F e M13R). Nem todas as caracterizações de seqüenciamento tiveram sucesso para ambos os iniciadores, dificultando a identificação da região exata da inserção de todo o fragmento que compreende o mini-Tn5 *luxCDBAE* (o tamanho do cassette *luxCDBAE* é de 5,8 kb). O clone da mutante CVmA5 foi a amostra melhor caracterizada. A partir de ambos os iniciadores a região regulatória da mutante CVmA5 foi encontrada entre as ORFs CV0642 a CV0645. Os produtos destes genes estão anotados como proteínas hipotéticas não apresentando similaridade com nenhum produto que tenha funcionalidade conhecida. Como foi feita digestão parcial de DNA cromossomal é possível que parte do transposon tenha sido digerido e o que parte deste fragmento que contém o gene que confere resistência a canamicina tenha sido ligado no vetor. Todos os clones foram selecionados através deste antibiótico, além de ampicilina, uma vez que o vetor pBluescript (usado na clonagem) tem um fragmento de seqüência de DNA que confere resistência à ampicilina. A partir destes resultados, novos iniciadores devem ser desenhados a partir da região apontada pelos iniciadores universais. Mesmo assim, os resultados obtidos nos dão a localização de regiões regulatórias que controlam a biossíntese de violaceína. As regiões de regulação apontadas nas mutantes CVmA5 e CVmA6 são de grande importância por ainda não terem sido exploradas e por não se ter conhecimento anterior sobre a atuação destas regiões como reguladores positivos da biossíntese de violaceína em *C. violaceum*. As outras regiões de inserção do transposon apontadas nas demais mutantes, parecem estar muito próximas aos genes *cviR* e *cviI*, confirmando que a regulação da produção de violaceína por mecanismo de sinalização *quorum sensing* também ocorre na linhagem ATCC 12472.

Como três tipos de moléculas sinais são produzidas por ATCC 12472, é possível que uma dessas moléculas tenha maior afinidade por CviR, induzindo e ativando a proteína regulatória que ativa o operon *vioABCD*. Por outro lado, uma outra molécula AHL pode atuar como um repressor que compete mas que não tem afinidade pela proteína CviR e não induz à dimerização da proteína regulatória. Neste caso, o controle seria negativo para a produção de violaceína, quando regulada por mecanismo *quorum sensing*. Além dos genes *cviI* e *cviR*, um conjunto de genes distante desta região (seqüência das ORFs CV0641 a CV0645 apontada na mutante CVmA5 e CV0081 apontada na mutante CVmA6 ), parece atuar de



mutante CVmA6. Acredita-se que o gene CV0081 pode atuar em precursores responsáveis pela proteína carregadora ACP e seu grupo acil, permite que CviI sintetize não apenas uma, mas três moléculas de AHL (HHL, OHHL, OdDHL) como identificado no organismo selvagem ATCC 12472. Embora um modelo de regulação possa ser especulado, o mecanismo de regulação destes genes não é conhecido e não se sabe exatamente como se dá a atuação destes genes no controle da biossíntese de violaceína. Sendo assim, é necessário que estes genes regulatórios sejam posteriormente explorados quanto à sua funcionalidade. A partir deste estudo sabe-se que os genes *cviI*, *cviR*, CV0081 e o bloco de genes CV0642-CV0645 fazem parte da rede regulatória da biossíntese de violaceína em *C. violaceum*.

Taylor (1997) sugeriu um modelo de regulação *quorum sensing* para a produção de violaceína, cianeto, e elastase para a linhagem de *C. violaceum* ATCC 31532. O circuito *quorum sensing* parece ser mais simples, uma vez que apenas uma molécula AHL é produzida por esta linhagem. Além dos genes *cviI* e *cviR*, uma forma de controle negativo também foi explorada neste trabalho, um gene que provoca a repressão de violaceína na linhagem selvagem ATCC 31532, sendo este provavelmente o repressor que caracteriza a pouca pigmentação nesta linhagem. Este gene foi caracterizado (Taylor, 1997) e no presente trabalho verificou-se que o mesmo apresenta homologia com os genes CV1055 (e-value=2e-51), CV0008 (e-value=5e-30), CV0009 (e-value=2e-19) e CV0645 (e-value=5e-04) da linhagem de *C. violaceum* ATCC 12472. Todos os produtos destes genes estão anotados como proteínas hipotéticas.

Alguns modelos de regulação *quorum sensing* têm sido propostos para outros microrganismos (Whitehead, 2001). O mais explorado dentre eles é o controle de virulência por regulação *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* (Latifi *et al.*, 1996; Whiteley *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* produz HHL via enzima RhlI, que também é responsável pela síntese de BHL em uma razão de aproximadamente 15:1 de BHL (Winson *et al.*, 1995). A expressão dos genes *rhlI/rhlR* é regulada pela sinalização da molécula OdDHL, que é produzida pela enzima LasI (Latifi *et al.*, 1996). A molécula OdDHL interage com a proteína LasR e BHL interage com RhlI, de modo que a regulação *quorum sensing* se dá em uma cascata hierárquica.

Acredita-se que o fato da linhagem *C. violaceum* ATCC 12472 sintetizar três moléculas AHL deve conferir ao microrganismo uma vantagem quanto à regulação por mecanismo *quorum sensing* de outros genes, atuando na regulação de controle negativo ou



positivo, ainda a ser explorado. A presença de mais de uma molécula de indução pode ser utilizada como controle positivo ou negativo da expressão de múltiplos genes sub regulados por *quorum sensing*, como ocorre em *P. aeruginosa*, capacitando a bactéria de responder rapidamente as mudanças ambientais.

## 5.10 Arquitetura da Rede de Regulação

A regulação de vias metabólicas é um problema complexo que exige uma grande quantidade de informação envolvendo genes, enzimas, proteínas e metabólitos que fazem parte de uma rede regulatória de um determinado produto. Na tentativa de entender como se dá a regulação e sua forma hierárquica dentro de determinados níveis de controle, é possível restringir a rede de forma a diminuir a complexidade do problema em uma primeira etapa de análise de seu comportamento. Para testar a rede de regulação da produção de violaceína em *C. violaceum*, utilizou-se a metodologia de Redes de Petri Híbrida para se estudar um primeiro modelo de regulação (Figura 5.35). A arquitetura da rede regulatória foi montada para demonstrar como ocorre o controle do operon *vioABCD* (genes responsáveis pela biossíntese de violaceína) sub-regulado pelo mecanismo *quorum sensing* e pelo ativador transcricional CAP-cAMP. Sabe-se que o mecanismo de regulação *quorum sensing* está envolvido na biossíntese de violaceína. Alguns dados experimentais foram utilizados para representar a produção de violaceína pela linhagem ATCC 12472. Além dos genes *cviI* e *cviR*, outros genes foram incorporados na rede (bloco de genes CV0642-CV0645 e gene CV0082), uma vez que verificou-se na prática experimental que o nocaute destes genes diminuem a produção do pigmento violeta em ATCC 12472. Para montar a rede regulatória utilizou-se o programa *Cell Illustrator* ([www.gene-networks.com/english/index.html](http://www.gene-networks.com/english/index.html)).

A rede foi montada a fim de prever o comportamento quanto à produção de violaceína quando *C. violaceum* é alimentada com diferentes fontes de carbono, glicose e glicerol, uma vez que temos dados cinéticos experimentais de produção de violaceína, obtidos em nossos laboratórios, e que conhecemos a estequiometria de consumo e geração de ATP na via glicolítica para estas duas fontes de carbono.

Sabe-se que quando é atingida uma certa concentração de glicose intracelular (concentração limite) ocorre à inibição da via de biossíntese de violaceína (provavelmente pela repressão de cAMP). Por outro lado, em baixa concentração de glicose ou quando fornecemos glicerol, o operon *vioABCD* é expresso através do ativador transcricional CviR e, conseqüentemente, a violaceína é produzida. Neste caso, é assumido que há L-triptofano e oxigênio molecular suficientes para a biossíntese de violaceína.

Quando glicerol é fornecido como fonte de carbono, sabemos que na via glicolítica, de glicerol até piruvato, o consumo de ATP cairá pela metade em relação à glicose. Então, para manter a estequiometria da reação, e para que a rede fosse testada, utilizaram-se valores discretos na via glicolítica (que está simplificada). Para outros produtos e subprodutos que fazem parte da rede regulatória, como cAMP, CAP, CviR, CviI, SAM, HACP (proteína carregadora do grupo acil), VioA, VioB, VioC, VioD e violaceína, atribuiu-se uma velocidade de geração e/ou consumo arbitrárias.

Os primeiros testes foram realizados utilizando-se as equações de transições apresentadas na Tabela 5.9. As primeiras simulações geradas satisfazem a observação experimental quanto à indução e repressão da produção de violaceína utilizando glicose e glicerol. Não temos dados quantitativos mas sabemos como a rede deve se comportar qualitativamente quando *C. violaceum* é alimentada com altas ou baixas concentrações de glicose e com altas ou baixas concentrações de glicerol. Por causa da estequiometria da reação na via glicolítica sabemos que a resposta do comportamento da rede para 1 mol de glicerol deve ser o mesmo que para 0,5 mol de glicose. Não se conhecem as concentrações limites que induzem ou reprimem a expressão do operon *vioABCD*, então estes valores devem ser explorados com ensaios experimentais.

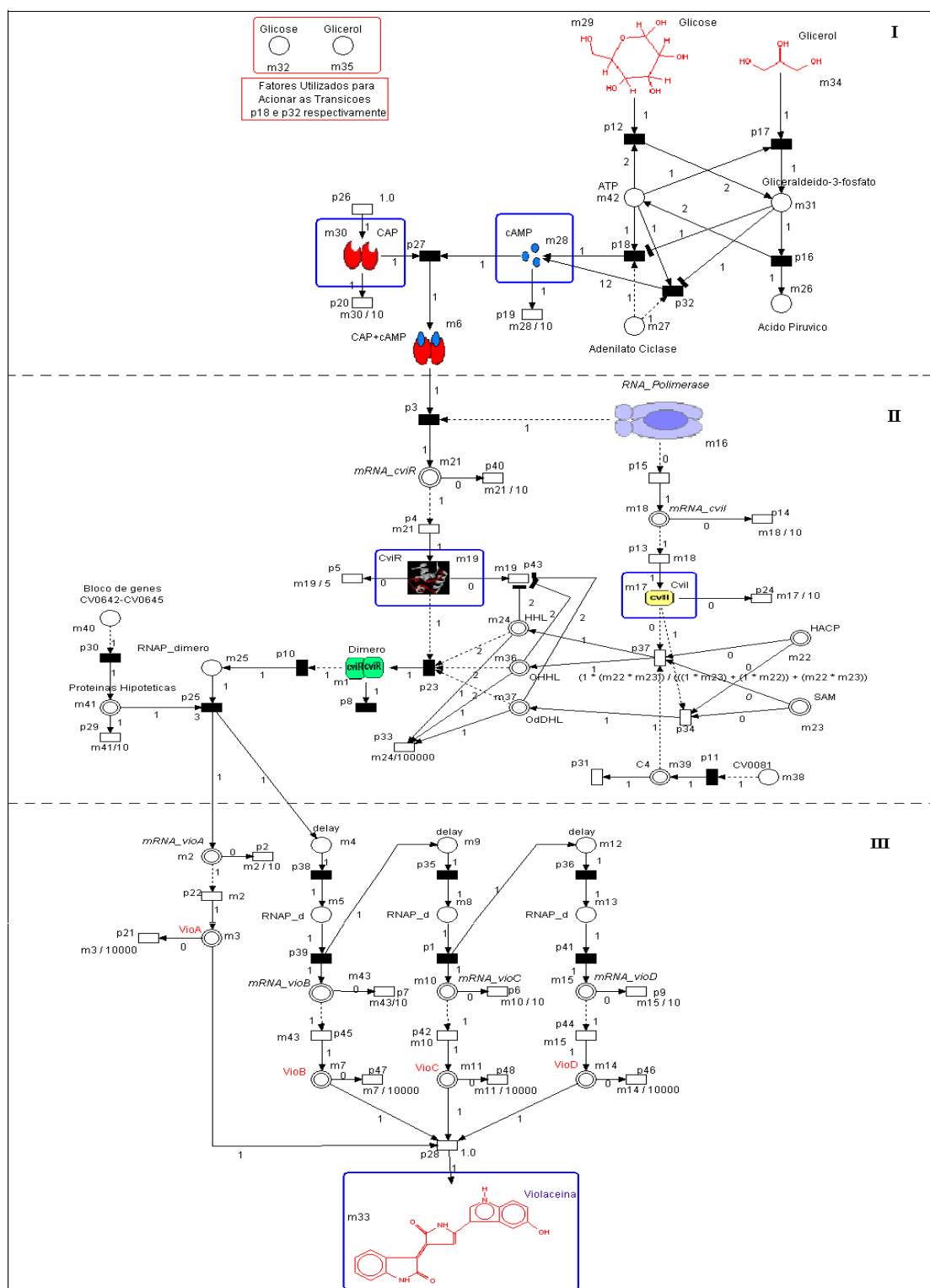


Figura 5.35 Arquitetura da rede regulatória do operon *vioABCD* em ATCC 12472 utilizando rede de Petri híbrida (Modelo construído com o software *Cell Illustrator*). Lugares contínuos, quando ícones, estão representados envoltos por um retângulo.

A Figura 5.35 mostra a arquitetura da rede de Petri para a regulação da produção de violaceína por *C. violaceum* (ATCC 12472). Na rede representada, as transições são denotados por  $p(p1...p48)$  e os lugares  $m(m1...m43)$ . A rede de regulação está dividida em três blocos, bloco I, bloco II e bloco III. O bloco I representa a alimentação da rede, simulando a entrada de dois substratos: glicose ou glicerol. Uma certa quantidade de ATP (variável representada por  $m42$ ) é gerada a partir de cada fonte de carbono e dispara a regulação por ativação transcricional do gene *cvrR* através do complexo cAMP-CAP ( $m6$ ). O bloco II mostra a expressão do gene *cvrR*, dando como produto a proteína regulatória CviR. Assume-se que o gene *cviI* é expresso de forma constitutiva e gera como produto a enzima CviI. Se os genes *cviI* ou *cvrR* forem nocauteados, assume-se que não ocorre produção de violaceína. A síntese de AHL se dá pela entrada dos substratos SAM (S-adenosil metionina) e o grupo acil-ACP, representado por HACP. Nesta parte da rede, o bloco de genes CV0642-CV0645 e o gene CV0081 estão representados, e se estiverem nocauteados (todos ou um deles) a produção de AHL será alterada, de acordo com o que foi observado experimentalmente. Por exemplo, se CV0081 for nocauteado (representado à esquerda), não haverá o produto do gene C4 (que representa o citocromo  $c4$ ) e apenas um tipo de molécula AHL será produzida, a OdDHL. À direita, se o bloco de genes CV0642-CV0645 for nocauteado, a síntese de AHL não será alterada, e será mantida a produção dos três tipos de moléculas AHL identificadas na linhagem selvagem de *C. violaceum* (HHL, OHHL, OdDHL). Neste caso, assume-se que a repressão de violaceína se dá diretamente sobre o operon *vioABCD* (Bloco III). As Tabelas 5.8-5.9 apresentam os tipos de lugares, as variáveis, as transições e os arcos e utilizados na rede de Petri que representa o modelo da regulação da produção de violaceína.

Tabela 5.8. Lugares e variáveis utilizadas na rede de Petri.

Lugares	Tipo	Variável
ATP	discreto	m42
Ácido pirúvico	discreto	m26
Adenilato Ciclase	discreto	m27
Bloco de genes CV0642 -CV0645	discreto	m40
C4	contínuo	m39
CAP	contínuo	m30
CAP+cAMP	discreto	m6
CV0081	discreto	m38
CviI	contínuo	m17
CviR	contínuo	m19
Dímero	discreto	m1
Gliceraldeído-3-fosfato	discreto	m31
Glicerol	discreto	m34
Glicerol	discreto	m35
Glicose	discreto	m29
Glicose	discreto	m32
HACP	contínuo	m22
HHL	contínuo	m24
OHHL	contínuo	m36
OdDHL	contínuo	m37
Proteínas hipotéticas	contínuo	m41
RNA_d	discreto	m8
RNA_d	discreto	m5
RNA_d	discreto	m13
RNA_dímero	discreto	m25
RNA_Polimerase	discreto	m16
RNA_Polimerase	discreto	m20
SAM	contínuo	m23
VioA	contínuo	m3
VioB	contínuo	m7
VioC	contínuo	m11
VioD	contínuo	m14
Violaceína	contínuo	m33
cAMP	contínuo	m28
delay	discreto	m9
delay	discreto	m4
delay	discreto	m12
mRNA_cviI	contínuo	m18
mRNA_cviR	contínuo	m21
mRNA_vioA	contínuo	m2
mRNA_vioB	contínuo	m43
mRNA_vioC	contínuo	m10
mRNA_vioD	contínuo	m15

Tabela 5.9. Propriedades da rede de Petri implementadas para representar semi-quantitativamente o modelo da regulação da biossíntese de violaceína.

Nome da Transição	Tipo	Transição
p1	discreto	step
p2	contínuo	m2/10
p3	discreto	step
p4	contínuo	m21
p5	contínuo	m19/5
p6	contínuo	m10/10
p7	contínuo	m43/10
p8	discreto	1
p9	contínuo	m15/10
p10	discreto	1
p11	discreto	step
p12	discreto	step
p13	contínuo	m18
p14	contínuo	m18/10
p15	contínuo	0,5
p16	discreto	3
p17	discreto	step
p18	discreto	step
p19	contínuo	m28/10
p20	contínuo	m30/10
p21	contínuo	m3/10000
p22	contínuo	m2
p23	discreto	1
p24	contínuo	m17/10
p25	discreto	3
p26	contínuo	1
p27	discreto	step
p28	contínuo	1
p29	contínuo	m41/10
p30	discreto	step
p31	contínuo	m39/0,2
p32	discreto	step
p33	contínuo	m24/100000
p34	contínuo	1
p35	discreto	step
p36	discreto	step
p37	contínuo	$(1*(m22*m23))/(((1*m23)+(1*m22))+(m22*m23))$
p38	discreto	step
p39	discreto	step
p40	contínuo	m21/10
p41	discreto	step
p42	contínuo	m10/10
p43	contínuo	m19/5
p44	contínuo	m15
p45	contínuo	m43
p46	contínuo	m14/10000
p47	contínuo	m7/10000
p48	contínuo	m11/10000

Tabela 5.10. Arcos utilizados na rede de Petri.

Nome do Arco	Tipo	Peso	Nome do Arco	Tipo	Peso
c01	processo	1,0	c54	processo	0,0
c02	processo	1,0	c55	teste	1,0
c03	inibidor	1,0	c56	processo	1,0
c04	processo	1,0	c57	processo	1,0
c05	processo	1,0	c58	processo	1,0
c06	processo	1,0	c59	processo	1,0
c07	processo	1,0	c60	processo	2,0
c08	teste	1,0	c61	processo	2,0
c09	teste	1,0	c62	processo	1,0
c10	teste	1,0	c63	processo	1,0
c11	processo	0,0	c64	processo	1,0
c12	processo	0,0	c65	processo	2,0
c13	processo	1,0	c66	processo	1,0
c14	processo	1,0	c67	processo	1,0
c15	teste	1,0	c68	processo	1,0
c16	teste	1,0	c69	processo	1,0
c17	processo	0,0	c70	teste	1,0
c18	processo	0,0	c71	inibidor	1,0
c19	processo	1,0	c72	processo	1,0
c20	processo	1,0	c73	processo	1,0
c21	processo	1,0	c74	processo	1,0
c22	processo	1,0	c75	processo	1,0
c23	processo	0,0	c76	processo	1,0
c24	processo	1,0	c77	processo	1,0
c25	processo	0,0	c78	processo	0,0
c26	processo	1,0	c79	processo	1,0
c27	processo	1,0	c80	processo	1,0
c28	processo	1,0	c81	processo	1,0
c29	processo	1,0	c82	processo	1,0
c30	processo	0,0	c83	processo	1,0
c31	processo	1,0	c84	processo	0,0
c32	processo	0,0	c85	teste	2,0
c33	processo	1,0	c86	teste	2,0
c34	processo	1,0	c87	inibidor	2,0
c35	processo	1,0	c88	inibidor	2,0
c36	processo	1,0	c89	teste	1,0
c37	processo	1,0	c90	processo	1,0
c38	processo	1,0	c91	processo	1,0
c39	teste	1,0	c92	processo	1,0
c40	processo	0,0	c93	teste	1,0
c41	processo	0,0	c94	processo	1,0
c42	processo	0,0	c95	processo	1,0
c43	processo	1,0	c96	processo	0,0
c44	teste	0,0	c97	teste	1,0
c45	teste	1,0	c98	processo	12,0
c46	teste	1,0	c99	processo	1,0
c47	teste	1,0	c100	processo	1,0
c48	processo	1,0	c101	processo	1,0
c49	processo	0,0	c102	processo	1,0
c50	inibidor	2,0	c103	processo	1,0
c51	processo	1,0	c104	processo	1,0
c52	teste	1,0	c105	processo	0,0
c53	teste	2,0			

A Figura 5.36 apresenta dados semi-quantitativos da produção de violaceína em diferentes condições de simulação, utilizando-se a rede de Petri híbrida (Figura 5.35).

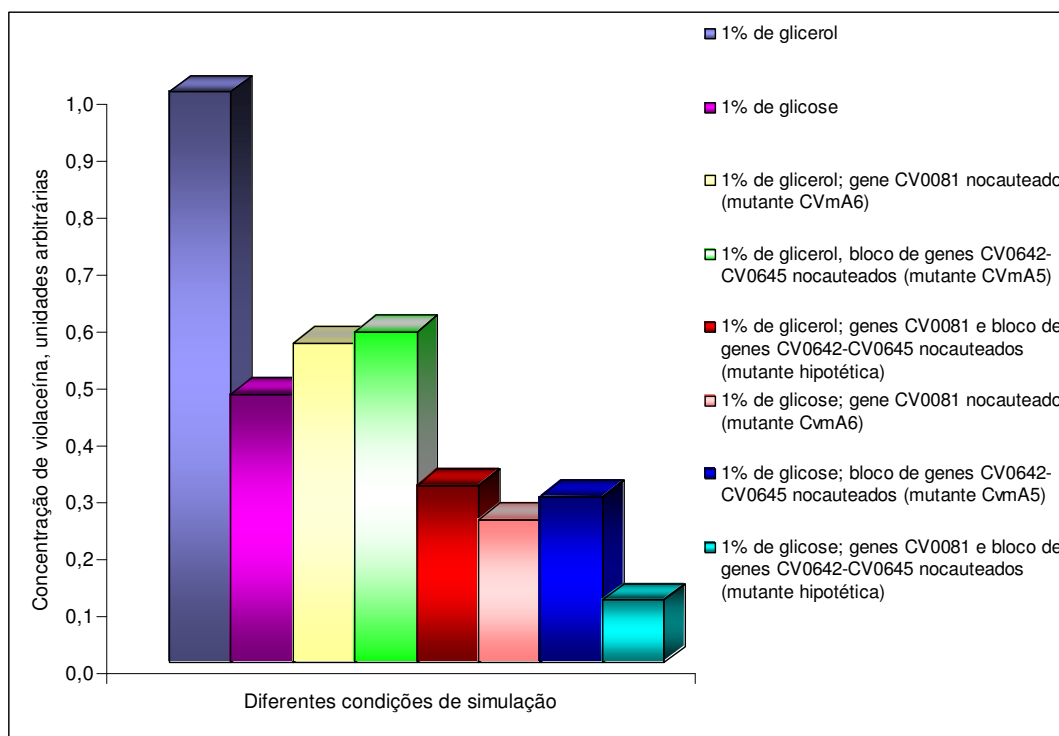


Figura 5.36. Produção de violaceína de acordo com diferentes condições de simulação da rede regulatória. A simulação foi feita através do software *Cell Illustrator* utilizando-se a arquitetura da rede de Petri híbrida. A condição de 1% de glicerol é considerada como controle positivo, alta produção de violaceína.

As condições de simulação para a produção de violaceína foram obtidas a partir das observações experimentais utilizando-se como fonte de carbono 1% glicose, ou 1% de glicerol, e nocauteando o bloco de genes CV0642-CV0645 e o gene CV0081, a partir das observações das mutantes CVmA5 e CVmA6 (Tabela 5.7).

Os resultados preliminares (Figura 5.36) mostram que é possível modelar a rede de regulação utilizando do modelo de rede de Petri híbrida. A simulação representa não apenas qualitativamente a rede regulatória mas também representa semi-quantitativamente dados referentes à concentração de violaceína produzida para a concentração de saturação de AHL no meio intercelular (aproximadamente de 0,11  $\mu\text{g/mL}$ ). A produção de violaceína em resposta à condição de 1% de glicerol é considerada como controle positivo. As outras condições geram a diminuição da produção do pigmento. Em algumas simulações o bloco



de genes CV0642-CV0645 e o gene CV0081 foram nocauteados, alimentando-se a rede com glicose e com glicerol. Para as simulações de nocauteamento, tanto do gene CV0081 quanto do bloco de genes CV0642-CV0645, a produção de violaceína diminui mais com glicose do que com glicerol, representado na Figura 5.36. Quando os dois nocauteamentos estão presentes, a produção do pigmento é menor para ambos os substratos, sendo mais deficiente em presença de glicose (Figura 5.36, mutantes hipotéticas). Observe que o uso de glicose como substrato já causa a repressão, independentemente do nocauteamento dos genes CV0081 e do bloco de genes CV0642-CV0645. Acredita-se que a repressão de violaceína será maior se glicose for a fonte de substrato das mutantes CVmA5 e CVmA6 (representado na Figura 5.36), mas estes dados ainda não foram obtidos experimentalmente. As diferenças entre as repressões causadas em cada condição, ainda não são conhecidas, mas podem ser exploradas a partir do estudo com as mutantes construídas neste estudo. O melhoramento da rede é possível e dependerá de mais informações a partir de dados experimentais que venham a contribuir quanto ao funcionamento e arquitetura da rede regulatória.

As informações quanto à regulação de um metabólito de interesse podem ser de grande valia em estudos de estratégias que possibilite, por exemplo a otimização de uma via metabólica. No caso de metabólitos de interesse farmacológico, como violaceína e seus derivados, a medida que se alcançarem melhorias na produção desta via, será possível viabilizar testes de atividade biológica dos metabólitos que são potencialmente ativos contra determinados organismos causadores de males, como bactérias patogênicas, vírus e também testes de atividade como agentes anti-tumorais.

## Capítulo 6 – Conclusões

A partir da informação genômica disponível de *Chromobacterium violaceum* e fazendo-se uso de estratégias experimentais de biologia molecular, os genes que regulam a biossíntese de violaceína bem como a regulação *quorum sensing* na linhagem de *C. violaceum* ATCC 12472 foram explorados neste estudo. Como principais conclusões extraídas dos resultados deste trabalho, destacam-se:

- Os genes *cviI* e *cviR* na linhagem de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 são responsáveis pela produção de violaceína a partir do mecanismo *quorum sensing* de sinalização celular, como verificada na linhagem ATCC 31532 em outro trabalho (McClean *et al*, 1997);

- O circuito de regulação *quorum sensing* deve ser diferente nas linhagens selvagens de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (neste estudo) e ATCC 31532 (McClean *et al*, 1997), uma vez que as moléculas indutoras AHL são diferentes nas duas linhagens;

- A linhagem selvagem de *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 produz uma molécula AHL de cadeia curta (HHL), enquanto que a linhagem selvagem de *C. violaceum* ATCC 12472 produz duas moléculas AHL de cadeia curta (HHL e OHHL) e uma molécula AHL de cadeia longa (OdDHL);

- Outros genes e regiões de regulação foram encontrados serem responsáveis pelo controle da produção de violaceína e estes são distintos de *cviI-cviR* e do operon *vioABCD*, sendo eles: CV0642, CV0643, CV0644 e CV0645, anotados como proteínas hipotéticas e CV0081, anotado como provável citocromo c4, envolvido na conservação de energia da célula;

- *C. violaceum* produz pouca violaceína em presença de glicose, e este fato é independente da presença de AHL no meio, levando a hipótese de que *cviR* não seja expresso por falta da ativação do complexo cAMP-CAP;

- Os resultados semi-quantitativos gerados a partir do modelo proposto para a regulação da produção de violaceína utilizando-se Redes de Petri Híbrida, mostram que é possível utilizar esta ferramenta para interpretar e prever uma rede de regulação biológica, e seu melhoramento dependerá dos dados experimentais que suportem a arquitetura e comportamento da rede regulatória.

# Sugestões para Trabalhos Futuros

Este trabalho revela informações importantes e até agora desconhecidas quanto a regulação da biossíntese de violaceína em *Chromobacterium violaceum*, linhagem ATCC 12472. A partir dos genes alvos apontados como regiões de regulação envolvidas no controle da produção de violaceína em *C. violaceum* sugere-se:

- A construção de mutantes por fusão transcricional dos genes alvos com os genes *luxCDBAC* sem a região promotora, para que seja possível acompanhar de forma dinâmica a expressão destes genes regulatórios a partir de variações ambientais, tais como presença de AHL no meio. Para isto, é necessário o uso combinado de equipamentos tais como o Luminômetro/Fotômetro que acompanham a variação da expressão gênica durante toda a fase de crescimento celular;
- Explorar o fenótipo e a resistência das mutantes construídas pela inserção de mini-Tn5 (CVm1, CVm3, CVmA5, CVmA6 e CVmB8) uma vez que foi observado que as mutantes com repressão de pigmento são menos resistentes que a linhagem selvagem ATCC 12472. Acredita-se que a produção de violaceína tenha um papel fundamental na sobrevivência e/ou adaptabilidade deste organismo, mas uma estratégia experimental deve ser planejada para que esta hipótese possa ser testada;
- Construir mutantes que caracterizem a repressão dos genes responsáveis pela produção de CRP (*catabolic repression protein*) e verificar se a violaceína é reprimida da mesma forma que ocorre quando há altas concentrações de glicose no meio. Verificar a forma de atuação do ativador transcricional cAMP-CRP sobre o gene *cviR*.

# APÊNDICE I – Estocagem de Bactérias e Preparo de Meio de Cultura

## Manutenção e estocagem de bactérias

### - Longo tempo de estocagem:

A partir de uma cultura, cultivada por aproximadamente 16 horas em meio LB, 1 mL de amostra foi centrifugado a 14000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado mais 1 mL da cultura para concentrar as células. A amostra foi centrifugada por mais 1 minuto e ressuspensa em 1 mL de LB fresco. Ao final adicionou-se aproximadamente 300µL de glicerol 100% (estéril) e a cultura foi estocada a -80°C.

### - Curto tempo de estocagem:

Culturas de *E. coli* foram cultivadas em placas com LB Agar e antibiótico apropriado e estocadas a 4°C. Culturas de *C. violaceum* foram cultivadas em placas com LB Agar e antibiótico quando necessário, e mantidas à temperatura ambiente. Novas placas eram preparadas a cada 7 dias.

## Reagentes

Os reagentes para ensaios e testes de biologia molecular foram adquiridos da Promega (Madison, USA), Gibco (Paisley, UK) ou Stratagene (Cambridge, UK). Os reagentes químicos foram adquiridos da BHD Ltd (Poole, UK), Aldrich Ltd (Gillingham, UK) ou Sigma Biochemicals (Poole, UK). Solventes com nível de purificação HPLC foram comprados de Fisons Scientific (Loughborough, UK). Meio de crescimento microbiológico foi adquirido da Oxoid (Basingstoke, UK).

### Meio de crescimento

Todos os meios foram preparados com água destilada e foram esterilizados em autoclave a 15 psi e 121°C por 20 minutos.

### Preparo de Meio

- Luria-Bertani (LB) – meio complexo líquido

Para 100 mL:

Triptona:	1 g
Extrato de levedura:	0,5 g
NaCl:	1 g

- Luria-Bertani (LB agar) – meio complexo sólido

Para 100 mL:

Triptona:	1 g
Extrato de levedura:	0,5 g
NaCl:	1 g
Agar (Oxoid No.3):	1,5 g

- Soft-top Agar

Para 200mL:

Triptona:	2 g
NaCl:	1 g
Agar (Oxoid No.3):	1,3 g

# APÊNDICE II – Preparo de Soluções

## Soluções tampão

TE (pH 8,0):            10 mM Tris.Cl (pH 7,4)  
                              1 mM EDTA (pH 8,0)

50x TAE:                242 g de Tris.Cl  
                              57,1 mL de ácido acético glacial  
                              100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0)  
                              H<sub>2</sub>O (duplamente destilada) até completar 1 L

DNA *loading buffer*:   2 mL de TAE (50x)  
                              1 mL de glicerol  
                              7 mL de H<sub>2</sub>O  
                              1 mg de azul de bromofenol



- Preparo de solução de CTAB

Para 100 mL:

- 4 g de em 80 mL de H<sub>2</sub>O;
- 10 g de brometo de cetil trimetil amônio;
- Aquecer a 65°C para dissolução;
- Completar o volume com água até 100 mL.

# Referências Bibliográficas

ADAR, Y. Y.; SIMAAN, M.; ULITZUR, S. Formation of the LuxR protein in the *Vibrio fischeri lux* system is controlled by HtpR through the GroESL proteins. **J. Bacteriol.**, v.174, n.22, p.7138-43. 1992.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A. *et al.* **Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell.** 1998.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. *et al.* Basic local alignment search tool. **J. Mol Biol**, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.

ANTÔNIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res.**, v.3, n.1, Mar 31, p.85-91. 2004.

ANTÔNIO, R. V. **Biossíntese de violaceína por *Chromobacterim violaceum*: Síntese e Atividades Biológicas de um Provável Intermediário.** 1994. 140 p. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,SP, Brasil.

ANTÔNIO, R. V.; PEREIRA, M. D. F.; HAUN, M. *et al.* **Trypanocycle activity of violacein.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, p.233. 1991.

ARTZ, S. W.; BROACH, J. R. Histidine regulation in *Salmonella typhimurium*: an activator attenuator model of gene regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.72, n.9, Sep, p.3453-7. 1975.

AUGUST, P. R.; GROSSMAN, T. H.; MINOR, C. *et al.* Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v.2, n.4, Oct, p.513-9. 2000.

BALLANTINE, J. A.; BEER, R. J.; CRUTCHLEY, D. J. *et al.* The synthesis of violacein and related compounds. **Proc. Chem. Soc.**, n.1, p.232-4. 1958.

BAIROCH, A.; BOECKMANN, B. The SWISS-PROT protein sequence data bank. **Nucleic. Acids Res.**, v.19 Suppl, Apr 25, p.2247-9. 1991.

BECKWITH, J. R. Regulation of the lac operon. Recent studies on the regulation of lactose metabolism in *Escherichia coli* support the operon model. **Science**, v.156, n.3775, May 5, p.597-604. 1967.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. STRYER, L. **Biochemistry**. W. H. Freeman and Co. New York. 2002.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic. Acids Res.**, v.28, n.1, Jan 1, p.235-42. 2000.

BESEMER, J.; BORODOVSKY, M. Heuristic approach to deriving models for gene finding. **Nucleic. Acids Res.**, v.27, n.19, Oct 1, p.3911-20. 1999.

BILTON, B. D.; JOHNSON, L. W. Recurrent nonfatal *Chromobacterium violaceum* infection in a nonimmunocompromised patient. **Infect. Med.**, v.17, p.p. 686-692. 2000.

BLOSSER, R. S.; GRAY, K. M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. **J. Microbiol. Methods**, v.40, n.1, Mar, p.47-55. 2000.

BOETTCHER, K. J.; RUBY, E. G. Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. **J. Bacteriol.**, v.177, n.4, Feb, p.1053-8. 1995.

BOISBAUDRAN, L. D. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Compt. Rend.**, n. 94, p.562. 1882.

CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M. *et al.* Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In: **International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology. Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Brasil, 1978. 121 p.

CARDOSO, J.; VALETTE, R. **Redes de Petri**. Editora da UFSC. Florianópolis. 1997

CHERNIN, L. S.; WINSON, M. K.; THOMPSON, J. M. *et al.* Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **J. Bacteriol.**, v.180, n.17, Sep, p.4435-41. 1998.

CHOI, S. H.; GREENBERG, E. P. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.88, n.24, Dec 15, p.11115-9. 1991.

CHOI, S. H.; GREENBERG, E. P. Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. **J. Bacteriol.**, v.174, n.12, Jun, p.4064-9. 1992(a).

CHOI, S. H.; GREENBERG, E. P. Genetic evidence for multimerization of LuxR, the transcriptional activator of *Vibrio fischeri* luminescence. **Mol. Biol. Biotechnol.**, v.1, p.408-13. 1992b.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, n.20, Sep 30, p.11660-5. 2003.

COOPER, M. **The Cell-A Molecular Approach**. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc. 2000.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANTÔNIO, R. V. Energetic metabolism of *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res.**, v.3, n.1, Mar 31, p.162-6. 2004.

DAVILLA, A. M. R. Bioinformatics in developing countries: how many tools are needed? In: **7th Intern. World Congress for Biomedical Sciences**, 2002. 1-3 p.

DE CROMBRUGGHE, E.; CHEN, B.; ANDERSON, W. B. *et al.* Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein in the initiation of lac transcription. **J. Biol. Chem.**, v.246, n.23, Dec 10, p.7343-8. 1971.

DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. **Methods. Enzymol.**, v.235, p.386-405. 1994.

DE LORENZO, V.; HERRERO, M.; JAKUBZIK, U. *et al.* Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. **J. Bacteriol.**, v.172, n.11, Nov, p.6568-72. 1990.

DEMOSS, R. D.; EVANS, N. R. Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells. **J. Bacteriol.**, v.78, Oct, p.583-8. 1959.

DOLAN, K. M.; GREENBERG, E. P. Evidence that GroEL, not sigma 32, is involved in transcriptional regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.174, n.15, Aug, p.5132-5. 1992.

DREW, S. W.; DEMAINE, A. L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.31, p.343-56. 1977.

DUCROS, V. M.; LEWIS, R. J.; VERMA, C. S. *et al.* Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Biol.**, v.306, n.4, Mar 2, p.759-71. 2001.

DUNLAP, P. V. Regulation of luminescence by cyclic AMP in *cya*-like and *crp*-like mutants of *Vibrio fischeri*. **J. Bacteriol.**, v.171, n.2, Feb, p.1199-202. 1989.

DUNLAP, P. V.; GREENBERG, E. P. Control of *Vibrio fischeri lux* gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-LuxR protein regulatory circuit. **J. Bacteriol.**, v.170, n.9, Sep, p.4040-6. 1988.

DURÁN, N.; ANTÔNIO, R. V.; HAUN, M. *et al.* Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.10, p.686-90. 1994.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.27, n.3, p.201-22. 2001.

EBERHARD, A.; T., L.; WIDRIG, C. A. *et al.* Synthesis of the *lux* gene autoinducer in *Vibrio fischeri* is positively autoregulated. **Arch. Microbiol.**, v.155, p.294-97. 1991.

EGLAND, K. A.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. **Mol. Microbiol.**, v.31, n.4, Mar, p.1197-204. 1999.

ENGEBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.81, n.13, Aug, p.4154-8. 1984.

FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.50, p.727-51. 1996.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **J. Bacteriol.**, v.176, n.2, Feb, p.269-75. 1994.

GILSON, L.; KUO, A.; DUNLAP, P. V. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. **J. Bacteriol.**, v.177, n.23, p.6946-51. 1995.

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S. *et al.* Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v.294, n.5550, p.2323-8. 2001.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; LEWONTIN, R. C. *et al.* **Introduction to Genetic Analysis**. W. H. Freeman & Co. New York. 1999.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H. *et al.* **Modern Genetic Analysis**. W. H. Freeman & Co. New York. 1999.

HANZELKA, B. L.; GREENBERG, E. P. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. **J. Bacteriol.**, v.177, n.3, Mar, p.815-7. 1995.

HILL, P. J. **Use of *lux* genes in microbiology**. PHLS Microbiol. Digest, p.215-218. 1997.

IMAMOTO, F. On the initiation of transcription of the tryptophan operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.60, n.1, Jun, p.305-12. 1968.

JACOB, F.; PERRIN, D.; SANCHEZ, C. *et al.* Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator. **C R Hebd Seances Acad. Sci.**, v.250, Mar 29, p.1727-9. 1960.

JACOB, F.; ULLMAN, A.; MONOD, J. The promotor, a genetic element necessary to the expression of an operon. **C R Hebd Seances Acad. Sci.**, v.258, Apr 16, p.3125-8. 1964.

JIANG, Y.; CAMARA, M.; CHHABRA, S. R. *et al.* *In vitro* biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-butanoyl-L-homoserine lactone. **Mol. Microbiol.**, v.28, n.1, May, p.193-203. 1998.

KAPLAN, H. B.; GREENBERG, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **J. Bacteriol.**, v.163, n.3, Oct, p.1210-4. 1985.

KOLIBACHUK, D.; GREENBERG, E. P. The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. **J. Bacteriol.**, v.175, n.22, Dec, p.7307-12. 1993.

KRISTI, A. E.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. **Mol Microbiol**, v.31, p.1197-204. 1999.

KUO, A.; BLOUGH, N. V.; DUNLAP, P. V. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. **J. Bacteriol.**, v.176, n.24, p.7558-65. 1994.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crys.**, v.26, p.283-91. 1993.

LATIF, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K. *et al.* A hierarquical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional acativators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase factor RpoS. **Mol. Microbiol.**, v.21, p.1137-1146. 1996.

MARTINELLI, D.; GROSSMANN, G.; SEQUIN, U. *et al.* Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. **BMC Microbiol.**, v.4, n.1, Jul 2, p.25. 2004.



MATHEWS, C. K.; VAN HOLD, K. E.; AHERN, K. G. **Biochemistry**. Addison Wesley Longman. 2000.

MATSUNO, H.; DOI, A.; NAGASAKI, M. *et al.* Hybrid Petri net representation of gene regulation network. In: **Pacific Symposium on Biocomputing**, 2000. p. 338-49. p.

MATSUNO, H.; DOI, A.; TANAKA, Y. *et al.* Genomic object net: Basic Architecture for Representing and Simulating Biopathways. Intelligent Systems for Molecular Biology. In. Copenhagen, 2001b. p.

MATSUNO, M.; DOI, A.; MATSUNO, H. *et al.* Biopathway model conversion from e-cell to genomic object net. **Genome Informatics**, v.12, p.290-91. 2001a.

MATSUNO, H.; TANAKA, Y.; Aoshima, H. *et al.* Biopathways representation and simulation on hybrid functional Petri net. **In Silico Biol.**, v.3, n. 3, p. 389-404. 2003.

MATSUSHIRO, A.; SATO, K.; ITO, J. *et al.* On the transcription of the tryptophan operon in *Escherichia Coli*. I. The tryptophan operator. **J. Mol. Biol.**, v.11, Feb, p.54-63. 1965.

McCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L. *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiol.**, v.143 (Pt 12), p.3703-11. 1997.

MEIGHEN, E. A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. **Microbiol Rev**, v.55, n.1, Mar, p.123-42. 1991.

MILLER, D. P.; BLEVINS, W. T.; STEELE, D. B. *et al.* A comparative study of virulent and avirulent strains of *Chromobacterium violaceum*. **Can. J. Microbiol.**, v.34, n.3, Apr, p.249-55. 1988.

MOMEN, A. Z.; HOSHINO, T. Biosynthesis of violacein: intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.64, n.3, Apr, p.539-49. 2000.

MORE, M. L.; FINGER, D.; STRYGER, J. L. *et al.* Enzymatic synthesis of a quorum-sensing auto-inducer through use of defined substrates. **Science**, v.272, p.1655-58. 1996.

MUNCH, R.; HILLER, K.; BARG, H. *et al.* PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. **Nucleic. Acids Res.**, v.31, n.1, Feb 1, p.266-9. 2003.

NAGASAKI, M.; DOI, A.; SASAKI, M. *et al.* Genomic Object Net in JAVA: A Platform for Biopathway Modeling and Simulation. **Genome Informatics**, v.13, p.252-53. 2002.

NASSER, W.; BOUILLANT, M. L.; SALMOND, G. *et al.* Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. **Mol. Microbiol.**, v.29, n.6, Sep, p.1391-405. 1998.

OLIVEIRA, G. C.; SGANZERLA, R. L.; PORTO, L. M. *et al.* Cinética do Crescimento Celular e Produção de Violaceína por *Chromobacterium violaceum* em Glicose e Glicerol como Fontes de Carbono. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM 2003**. Florianópolis, SC, 2003. T-388, p.7 p.

PARSEK, M. R.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L. *et al.* Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v.96, n.8, Apr 13, p.4360-5. 1999.

PEMBERTON, J. M.; VICENT, K. M. PENFOLD, R. J. Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. **Curr. Microbiol.**, v.22, p.355-58. 1991.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E. *et al.* Bioinformática, Manual do usuário. In: (Ed.): **Biotechnol. Ciência e Desenv.**, v.29, 2003. Bioinformática, Manual do usuário, p.12-25.

PROSSER, J. I.; KILLHAM, K.; GLOVER, L. A. *et al.* Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.16, p.157-183. 1997.

QIN, Y.; LUO, Z. Q.; SMYTH, A. J. *et al.* Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. **Embo J**, v.19, n.19, Oct 2, p.5212-21. 2000.

RAMACHANDRAN, G. N. Molecular forces in protein structure and crystallography. **Int. J. Protein Res.**, v.1, n.1, p.5-17. 1969.

REDDY, V. N. **Modeling biological pathways: A discrete event systems approach.** 1994. (Dissertação de Mestrado)-Chemical Engineering, The University of Maryland, Maryland, EUA.

RETTORI, D. **Estudos físico-químicos e biológicos da violaceína: um pigmento produzido pela *Chromobacterim violaceum*.** 2000. 139 p. (Tese de Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

RETTORI, D. **Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido por *Chromobacterium violaceum*.** 1996. 44 p. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

REZNIKOFF, W. S. Catabolite gene activator protein activation of *lac* transcription. **J. Bacteriol.**, v.174, n.3, Feb, p.655-8. 1992.

ROTH, J. R.; SILBERT, D. F.; FINK, G. R. *et al.* Transfer RNA and the control of the histidine operon. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v.31, p.383-92. 1966.

RUBY, E. G. The *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* symbiosis: a biomedical model for the study of bacterial colonization of animal tissue. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v.1, n.1, Aug, p.13-21. 1999.

SCHAEFER, A. L.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L. *et al.* Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.93, n.18, Sep 3, p.9505-9. 1996.

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N. *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic. Acids Res.**, v.31, n.13, Jul 1, p.3381-5. 2003.

SIMPSON, R. B. Interaction of the cAMP receptor protein with the lac promoter. **Nucleic. Acids Res.**, v.8, n.4, Feb 25, p.759-66. 1980.

SLOCK, J.; VANRIET, D.; KOLIBACHUK, D. *et al.* Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. **J. Bacteriol.**, v.172, n.7, Jul, p.3974-9. 1990.

SOUZA, A. O.; AYLI, D. C. G.; SATO, D. N. *et al.* *In vitro* activity of violacein against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v.58, p.59-62. 1999.

STWART G.S.A.B. Challenging food microbiology from a molecular perspective. **Microbiol.**, v. 143, p. 2081-99. 1997.

STWART G.S.A.B.; LOESSNER M.J.; SCHERER S. The bacterial *lux* gene bioluminescent biosensor revisited. **Am. Soc. Microbiol. News**, v.62, p. 297-301. 1997.

STEINBUCHER, A.; DEBZI, E. M.; MARCHESSAULT, R. H. *et al.* Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v.39, p.443-49. 1993.

STEVENS, A. M.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. *et al.* Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. **J. Bacteriol.**, v.181, n.15, Aug, p.4704-7. 1999.

STEVENS, A. M.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. **J. Bacteriol.**, v.179, n.2, Jan, p.557-62. 1997.

TAYLOR, A. M. **Quorum sensing and the regulation of gene expression in *Chromobacterium violaceum***. 1997. 204 p. (Tese de doutorado)-Pharmacy School; Institute of Infection, Immunity and Inflammation., The University of Nottingham, Nottingham.

TEUSINK, B.; PASSARGE, J.; REIJENGA, C. A. *et al.* Can yeast glycolysis be understood in terms of *in vitro* kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. **Eur. J. Biochem.**, v.267, n.17, Sep, p.5313-29. 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic. Acids Res.**, v.22, n.22, Nov 11, p.4673-80. 1994.

THROUP, J. P.; CAMARA, M.; BRIGGS, G. S. *et al.* Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. **Mol. Microbiol.**, v.17, n.2, Jul, p.345-56. 1995.

TROTT, A. E.; STEVENS, A. M. Amino acid residues in LuxR critical for its mechanism of transcriptional activation during quorum sensing in *Vibrio fischeri*. **J. Bacteriol.**, v.183, n.1, Jan, p.387-92. 2001.

VAL, D. L.; CRONAN, JR. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. **J. Bacteriol.**, v.180, n.10, May, p.2644-51. 1998.

VILLANI, E. **Abordagem Híbrida para Modelagem de Sistemas de Ar Condicionado em Edifícios Inteligentes**. 2000. (Dissertação de Mestrado)-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

VISICK, K. L.; MCFALL-NGAI, M. J. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. **J. Bacteriol.**, v.182, n.7, Apr, p.1779-87. 2000.

WALKER, M.; PAVLOVIC, V.; KASIF, S. A comparative genomic method for computational identification of prokaryotic translation initiation sites. **Nucleic. Acids Res.**, v.30, n.14, Jul 15, p.3181-91. 2002.

WELCH, M.; TODD, D. E.; WHITEHEAD, N. A. *et al.* N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. **Embo J.**, v.19, n.4, Feb 15, p.631-41. 2000.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M.; SLATER, H. *et al.* Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.25, n.4, Aug, p.365-404. 2001.

WHITELEY, M.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v.182, n.15, Aug, p.4356-60. 2000.

WINSON, K. M.; BAINTON, N. J.; CHHABRA, S. R. *et al.* Control of N-acylhomoserine lactone-regulated expression of multiple phenotypes in *Chromobacterium violaceum*. In: **Proceedings of 94 th Annual Meeting of American Society for microbiology**. Las vegas, USA, 1994. 212 p.

WINSON, K. M.; CAMARA, M.; LAFITTI, A. *et al.* Multiple N-acylhomoserine lactone signal molecules regulate expression of virulence and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.92, p.9427-9431. 1995.

WINSON, K. M.; SWIFT, S.; HILL, P. J. *et al.* Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobactrus luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promote plasmids and mini-Tn5 constructs. **FEMS Microbiol. Let.**, v.163, p.193-202. 1998.

WINTIENS, R.; ROOMAN, M. Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. **J. Mol. Biol.**, v.262, n.2, Sep 20, p.294-313. 1996.

ZHU, J.; WINANS, S. C. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.96, n.9, Apr 27, p.4832-7. 1999.

ZHU, J.; WINANS, S. C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.98, n.4, Feb 13, p.1507-12. 2001.